

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivona Krizman

**Genotoksični učinci hipertermije, citostatika cisplatine i  
propolisa na zdrave i tumorske stanice miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF – a, pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici Prof. dr. sc., Nadi Oršolić na nesebičnoj pomoći, susretljivosti i savjetima tijekom izrade rada.*

*Hvala mojoj obitelji, roditeljima Ranku i Ljerki te sestri Martini, na podršci tijekom studiranja i razumijevanju.*

*Zahvaljujem mom Marku na moralnoj i informatičkoj podršci te strpljenu.*

*Hvala mojim prijateljicama na podršci i vjeri.*

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **GENOTOKSIČNI UČINCI HIPERTERMIJE, CITOSTATIKA CISPLATINE I PROPOLISA NA ZDRAVE I TUMORSKE STANICE MIŠA**

Ivona Krizman

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltove trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

### **SAŽETAK**

Novi pristup u liječenju tumora temelji se na primjeni kemoimunoterapije i hipertermije. Takav način liječenja može prouzročiti visoku protutumorsku učinkovitost na stanice tumora te nisku toksičnost na zdrave stanice i cjelokupni organizam nositelja tumora. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti genotoksični i citotoksični učinak citostatika cisplatine i propolisa sa i bez primjene hipertermije na miševne nositelje Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT-a) metodom alkalnog komet testa. Tumor smo prouzročili injiciranjem  $2 \times 10^6$  tumorskih stanica u trbušnu šupljinu miševima soja Swiss albino. U preventivnoj obradi, miševima smo sedam i tri dana prije unosa tumorskih stanica *i.p.* injicirali pripravak vodene otopine propolisa ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Kemoterapiju ( $37^\circ\text{C}$ ) i hipertermičku kemoterapiju ( $43^\circ\text{C}$ ) s citostatikom cisplatinom ( $5$  ili  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) primijenili smo 3. dan nakon injiciranja tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu. Rezultati alkalnog komet testa ukazuju na sinergistički učinak hipertermije, citostatika cisplatine te imunoterapije s propolisom u povećanoj zaštiti molekula DNA u leukocitima te stanicama jetre i bubrega od oštećenja uzrokovanih toksičnim učincima cisplatine. Imunomodulacija te smanjena toksičnost citostatika cisplatine s propolisom vjerojatno je mogući mehanizam protutumorske učinkovitosti. Analizom rezultata zaključili smo da propolis i njegove flavonoidne sastavnice združeni s kemoterapeutcima mogu povećati protutumorski učinak kemoterapeutika, što sugerira moguću kliničku uporabu u cilju povećanja imunosti organizma te smanjenja štetnih učinaka kemoterapeutika na normalne stanice i tkiva.

(stranica - 59, slike - 2, tablica - 9, literaturnih navoda - 33, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.

**Ključne riječi:** propolis, cisplatina, hipertermija, Ehrlichov ascitesni tumor, komet test

**Mentor:** Dr. sc. Nada Oršolić, izv. prof.

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Nada Oršolić, izv. prof., Dr. sc. Ines Radanović, doc.,  
Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, doc., Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

**Zamjena:** Dr. sc. Ivana Maguire

**Rad prihvaćen:** 7. travnja 2010.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

## **GENOTOXIC EFFECTS OF HYPERTHERMIA, CYTOSTATIC CISPLATIN AND PROPOLIS ON NORMAL AND TUMOUR CELLS IN MICE**

Ivona Krizman

Laboratory of Animal Physiology, Department of Biology  
Faculty of Science, University of Zagreb  
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

### **SUMMARY**

A new approach to cancer treatment is based on the application chemoimmunotherapy and hyperthermia. This approach may cause a high anticancer efficiency on tumor cells and low toxicity to the healthy immune cells in the body and the holder of the tumor. The aim of this study was to explore citotoxic and genotoxic effects of citostatic cisplatin and propolis with and without hyperthermia in mice bearing Ehrlich ascites tumor (EAT) using the method of alkaline comet assay. Tumors were caused by injection of  $2 \times 10^6$  tumor cells into the abdominal cavity of Swiss albino mice. Seven and three days before implantation of EAT cells the mice were injected with water solution of propolis ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) into the abdominal cavity. Chemotherapy ( $37^\circ\text{C}$ ) and hypothermic chemotherapy ( $43^\circ\text{C}$ ) with cisplatin ( $5$  or  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) were given on the 3rd day after the tumor cell injection into the abdominal cavity of mice. These results of alkaline comet assay suggest the synergistic effect of hyperthermia, citostatic cisplatin and immunotherapy with propolis in increased DNA protection of leukocytes, liver and kidney cells from damages caused by toxic effects of cispaltin. It is likely that immunomodulation of propolis and reducing toxicity of chemotherapy treatment with propolis may be possible mechanism of antitumor efficiency. The analysis of the results has led us to the conclusion that the combination of water solution of propolis with chemotherapeutics could increase the antitumor potential of chemotherapeutic agents which suggests the benefits of potential clinical use in order to maximize immunity of organism and minimize harmful effects of chemotherapeutic agents on normal cells and tissues.

(pages - 59, figures - 2, tables - 9, references - 33, original is in Croatian)

Thesis deposited in Central library of Department of Biology, Rooseveltov trg 6.

**Keywords:** propolis, cisplatin, hyperthermia, Ehrlich ascites tumor, comet assay

**Supervisor:** Dr. Nada Oršolić, Assoc. Prof.

**Reviewes:** Dr. Nada Oršolić, Assoc. Prof., Dr. Ines Radanović, Asst. Prof.,  
Dr. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof., Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.

**Substitute:** Dr. Ivana Maguire, Asst. Prof.

**Thesis accepted:** April, the 7th, 2010.

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tumori i njihove karakteristike .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Klasifikacija tumora .....	2
1.1.2 Molekularno genetička osnova tumora .....	3
1.1.3 Imunoreakcija na tumor .....	5
1.1.3.1 Tumorski antigeni.....	5
1.1.3.2 Imunološka otpornost na tumor .....	5
1.1.4 Karcinogeneza .....	6
1.1.4.1 Kemijska karcinogeneza.....	6
1.1.4.2 Mehanizam kemijske karcinogeneze .....	7
1.1.4.3 Fizikalna karcinogeneza .....	8
1.1.4.4 Biološka karcinogeneza .....	8
1.1.5 Širenje raka.....	9
1.1.5.1 Invazivnost.....	9
1.1.5.2 Nastanak metastaza.....	10
1.1.5.3 Angiogeneza .....	10
1.1.6 Liječenje tumora.....	11
<b>1.2 Propolis .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Što je propolis i kako nastaje ? .....	15
1.2.2. Kemijska i fizikalana svojstva propolisa.....	16
1.2.3. Biološka svojstva propolisa.....	17
<b>1.3 Citostatici .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Mehanizam djelovanja citostatika .....	24
1.3.2 Otpornost citostatika.....	25
1.3.3 Cisplatina .....	25

<b>1.4</b>	<b>Hipertermija .....</b>	<b>27</b>
1.4.1	Biološki učinci hipertermije .....	28
1.4.2	Hipertermija i kemoterapija.....	29
<b>2.</b>	<b>CILJ RADA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Materijali korišteni u istraživanju .....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Pokusne životinje .....	32
3.1.2	Tumorske stanice.....	32
3.1.3	Propolis.....	32
3.1.3.1	Vodena otopina propolisa .....	33
3.1.3	Citostatik .....	33
<b>3.2</b>	<b>Metode korištene u istraživanju .....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Postupak sa životinjama .....	33
3.2.2	Intraperitonealna hipertermija .....	33
3.2.3	Komet test .....	34
3.3	Statistička obrada rezultata .....	36
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>56</b>

# 1. UVOD

Tumor u čovjeka prvi put se spominje prije 5300 – 5400 godina, ali se pretpostavlja da ljudi nikad nisu bili zaštićeni od neke forme deregulacije biološke kontrole staničnog rasta. Epidemiologija zloćudnih novotvorina u svom suvremenom obliku počinje 1950. godine objavljivanjem rezultata istraživanja o tumoru pluća i pušenju, iako je i prije bilo epidemioloških radova.

Tumor je, iako se pojavljuje i u dječjoj dobi, rijedak prije 30. godine života, a njegova se učestalost povećava s dobi.

Vodeći tumor u svijetu po učestalosti je tumor pluća, debelog crijeva, prostate i dojke. Kod žena u svijetu se na prvom mjestu, po mortalitetu i broju novih dijagnostificiranih slučajeva u određenom razdoblju, nalazi tumor dojke dok je na drugom mjestu tumor grlića maternice.

U Hrvatskoj zbog tumora umire na godinu više od 10 000 stanovnika tj. svaki peti umrli.

Tumor se nalazi na drugom mjestu uzroka smrti, iza bolesti krvožilnog sustava.

Starost je najvažniji čimbenik za tumor zbog duže izloženost čimbenicima rizika koji direktno ili indirektno povećavaju rast tumora. Čimbenici rizika za nastanak tumora su način života (prehrana, stres, duhan, alkohol), razni čimbenici kemijskog podrijetla (izloženost karcinogenima na radnom mjestu, neki lijekovi, proizvodi industrijske proizvodnje), biološkog podrijetla (tumorski virusi) i fizikalni čimbenici (izlaganje suncu, ionizirajuće i UV zračenje) te genetska predispozicija.

## 1.1 Tumori i njihove karakteristike

Po svom izvornom značenju pod tumorom podrazumijevamo (lat. *tumor*-oteknuće) svaku oteklinu ili povećanje tkiva koje često susrećemo tijekom upalnog procesa. Unatoč tomu, ovaj latinski naziv se najčešće upotrebljava kod opisivanja specifičnijih bolesti koje su karakterizirane autonomnim, nenormalnim, nesvrshodnim i neprestanim rastom atipičnih stanica koji perzistira i nakon što je prestao djelovati početni čimbenik koji je ovakav rast uzrokovao. Ovakve otekline nazivaju se još i novotvorinama, odnosno neoplazijama i blastomima. Ipak, najpoznatiji termin u svakodnevnoj uporabi je rak ili karcinom.



Svim tumorima zajedničko je što rastu autonomno bez ikakve kontrole, morfološki i funkcionalno podsjećaju u određenoj mjeri na normalne stanice iz kojih su nastali, rastu nekoordinirano u odnosu na rast normalnog tkiva i ne obavljaju nikakvu normalnu funkciju u domaćinu. Nastaju kao posljedica brojnih uzroka koji mijenjaju molekularna zbivanja uključena u normalnu regulaciju proliferacije i diferencijacije stanica (Grabarević, 2002).

Jedno od temeljnih svojstava raka je monoklonalnost tumora, nastanak tumora iz jedne stanice koja počinje nenormalno proliferirati. Monoklonalno podrijetlo tumora, međutim, ne implicira da je ishodišna stanica u početku stekla sve značajke stanica raka. Nastanak raka je proces koji se sastoji od više koraka tijekom koji stanice zbog niza progresivnih promjena postupno postaju zloćudne (Cooper i Hausman, 2004).

Tumor je unatoč svojem monoklonskom podrijetlu heterogen što znači da se stanice istog tumora razlikuju fenotipski i genotipski (Šamija i sur. 2006).

Sastavljeni su od dvije osnovne komponente: parenhima (srž, skupina specifičnih stanica) i strome (osnovno tkanje). Parenhim čine neoplastične, proliferirajuće stanice, dok je stroma vezivnotkivna osnova koja pruža fizikalno-mehaničku podršku rastu tumorskih stanica te u isto vrijeme osigurava njihovu opskrbu krvlju (Grabarević, 2002).

Sadržaj DNK u stanicama je, u odnosu na normalne stanice, znatno promijenjen; najčešće je broj kromosoma veći od normalnog diploidnog. Osim povećanja količine DNK, u tumorima su nazočne i kromosomske nepravilnosti, primjerice dodatni kromosomi ili kromosomske translokacije.

Osim količine DNK u tumorskoj stanici, za rast tumora važna su još dva obilježja: mitozu i apoptozu (genski određena smrt stanice). Maligni tumori imaju veći broj mitozu u odnosu na tkivo od kojega su nastali.

Jedna od zajedničkih karakteristika jest sklonost anaerobnoj glikolizi i stvaranju mliječne kiseline u uvjetima nedostatne količine kisika (Grabarević, 2002).

Najveće značenje u nastanku tumora imaju genske promjene (onkogeni i geni supresije tumora).

### **1.1.1 Klasifikacija tumora**

Tumori se prema biološkom ponašanju dijele na benigne, maligne i semimaligne.

Najbitnija klinička razlika između njih je da benigni tumori ne stvaraju metastaze i cijeli njihov rast događa se na istom mjestu.

Po pravilu rastu sporo i ekspanzivno, ne invadiraju okolno tkivo, često su inkapsularni i histološki uvelike podsjećaju na tkivo iz kojega su nastali. Klinički problemi koje mogu izazvati benigni tumori su: pritisak na okolno tkivo, prekid cirkulacije ili prolaska sadržaja, stvaranje hormona i mogući nastanak maligne varijante istog tumora.

Maligni tumori su invazivne, brzo rastuće, slabo ograničene neoplazme. Postoje četiri osnovna patološkomorfološka obilježja malignosti:

- 1) Diferencijacija i anaplazija - pod diferencijacijom podrazumijevamo stupanj do kojega tumorske stanice morfološki odgovaraju normalnom tkivu, a anaplazijom označavamo smanjenje diferencijacije tumorskih stanica.
- 2) Mitotska aktivnost - često povećan broj mitoz.
- 3) Invazivnost - pouzdana dijagnoza malignosti postavlja se utvrđivanjem invazije krvnih i limfnih žila tumorskih stanica.
- 4) Metastaze - neki maligni tumori ipak vrlo rijetko, ako uopće, metastaziraju, ali istodobno imaju sva ostala obilježja malignosti te se klasificiraju kao semimaligni. (Grabarević, 2002).

Tumori se razlikuju prema vrsti tkiva iz kojih nastaju:

Adenom – potječe iz žljezdanog tkiva ili svojim rastom stvara sliku žljezdanog tkiva

Karcinom – nastaje iz epitelnog tkiva (koža i sluznica)

Sarkom - nastaje iz vezivnog tkiva (kosti)

Papilom – dobroćudni epitelni tumor koji stvara resičaste tvorbe

Polip – izbočuje se iznad površine sluznice kao vidljiva masa (Kumara i sur. 2000).

### 1.1.2 Molekularno genetička osnova tumora

Tri su osnovne skupine gena koji su važni za nastanak tumora: onkogeni, tumor supresorski geni i geni za popravak pogrešaka u DNA molekuli (Šamija i sur. 2006).

Te skupine gena u normalnim okolnostima imaju važne uloge u regulaciji staničnog ciklusa i diferencijaciji.

Normalan varijanta **onkogen** su protoonkogeni – skupina od stotinjak gena koji su evolucijski dobro sačuvani što upućuje i na njihovu važnost. Promjena strukture ili funkcije tih gena naziva se aktivacija te se u tom slučaju nazivaju onkogenima.

Onkogeni su funkcionalno ili strukturno promijenjeni protoonkogeni. S obzirom na to da ti geni u normalnim okolnostima nadziru i reguliraju stanični ciklus, njihova će promjena rezultirati deregulacijom diobe stanica (Šamija i sur. 2000).

Putevi prijenosa signala u stanici način su na koji se stanični rast, dioba i diferencijacija usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Signali koje stanica prima iz okoliša često su u obliku malih molekula, čimbenika rasta, koji se najčešće vežu na receptore na staničnoj membrani, te se na taj način aktiviraju i prenose signale preko brojnih drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju pojedinih gena. Putevi prijenosa u stanici su najčešće vrlo složeni i redundantni. Ako se protoonkogeni promijene na način da oni sami ili njihovi proteinski proizvodi postanu aktivniji, do čega može doći ili zbog mutacija u samim protoonkogenima ili zbog njihove pojačane ekspresije, tada nastaju onkogeni. Posljedica takve aktivacije onkogeni jest nekontroliran rast i dioba stanice, što uzrokuje nastanak raka (Šamija i sur. 2006).

Tri su mehanizma aktivacije onkogeni: *mutacija*, *translokacija* i *amplifikacija*. Kad je riječ o mutacijama, najčešće su tzv. **točkaste mutacije**, pri čemu se jedan nukleotid zamijeni drugim, što rezultira najčešće kodiranjem pogrešnog proteina. Točkasta mutacija jednog nukleotida dovoljna je da posve promijeni njegovu funkciju.

**Translokacija** je premještanje dijelova kromosoma i spajanje s drugim. Preuredbe onkogeni odnosno kromosoma najčešće se zbivaju translokacijom kromosoma, gdje točka loma na kromosomu koji se premješta često zahvaćaju one regije koje se aktivno prepisuju, uključujući i onkogene.

Čest mehanizam aktivacije onkogeni je i **amplifikacija**. Amplifikacija označava prekomjernu aktivnost nekog gena.

**Tumor-supresorski geni** kodiraju proteine koji inhibiraju stanični ciklus i sudjeluju u nadzoru popravaka oštećenja DNA. Funkcija i/ili struktura tih gena vrlo je često izgubljena ili promijenjena u stanicama raka. Gubitak funkcije tih gena tipična je pojava u raka, a najčešće je posljedica mutacija. S obzirom na to da su proteinski proizvodi supresorskih gena negativni regulatori stanične proliferacije, gubitak njihove ekspresije u stanicama tumora vodi k pojačanoj proliferaciji stanica, što ubrzava razvoj zloćudnog tumora (Šamija i sur. 2000).

***Geni za popravak pogrešaka u DNA molekuli*** - nedjelotvornost popravaka pogrešno sparenih baza dovodi do genske nestabilnosti i nakupljanja mutacija u stanici, što povećava vjerojatnost nastanka tumora.

### **1.1.3 Imunoreakcija na tumor**

Pretpostavlja se da je jedna od važnijih funkcija imunološkog sustava i zaštita organizma od nastanka tumora. To je iznimno teška zadaća jer tumorske stanice posjeduju brojne sličnosti sa zdravim stanicama, nasuprot pogubnom svojstvu umnožavanja i širenja organizmom, te su stoga tumorske stanice dodatni izazov za imunološki sustav. Posebno važno svojstvo imunološkog sustava je sposobnost djelovanja na razini cijelog organizma (Šamija i sur. 2006).

#### ***1.1.3.1 Tumorski antigeni***

U imunološkom odgovoru protiv tumora važnu ulogu imaju mehanizmi stanične imunosti posredovani T limfocitima.

***Tumorski antigeni (TA)*** su molekule koje se nalaze na površini tumora te njih imunološki sustav prepoznaje kao tuđe i na njih reagira imunosnom reakcijom. Većina tumorskih antigena se ne razlikuje od ostalih antigena koje prepoznaju limfociti T.

Postoje dvije vrste tumorskih antigena:

***Tumor specifični antigeni (TSA)*** koji su specifični za tumor i ne nalaze se na normalnim stanicama ili mogu biti izraženi na normalnim stanicama samo u određenoj fazi razvitka. U tom slučaju organizam nije na njih stvorio imunosnu toleranciju te reagira na njih kad ih pojačano izražavaju tumorske stanice.

***Tumoru pridruženi antigeni (TAA)*** nisu isključivo vezani za tumorske stanice već se nalaze na nekim stanicama embrijskog tkiva, na stanicama za vrijeme virusne infekcije ili u normalnim stanicama, ali u niskoj koncentraciji.

#### ***1.1.3.2 Imunološka otpornost na tumor***

U reakciju na tumorske stanice uključeni su nespecifični oblici imunosti te oba oblika specifične imunosti (stanični i humoralni).

Stanična imunost uključuje djelovanje limfocita T, stanica NK, makrofaga, monocita, mastocita, eozinofila te drugih polimorfonuklearnih leukocita. Ona ima glavnu ulogu u domaćinovoј imunosnoj obrani od tumora.

Citotoksični limfociti T mogu pri izravnom dodiru uništiti tumorsku stanicu, a mehanizam ubijanja jednak je mehanizmu u drugim oblicima stanične imunosti. Sposobnost ubijanja imaju senzibilizirani limfociti iz imuniziranih davalaca, ali i iz nosilaca progresivnog tumora. Senzibilizirani limfociti T u dodiru s antigenom otpuštaju niz tvari (citokinini) koji imaju različite važne biološke učinke. Međutim, tumori, za razliku od bakterija i virusa, ne izazivaju pojavu protupalnih citokina i kemokina potrebnih za suradnju predočenih stanica i limfocita T specifičnih za antigen.

Stanice NK mogu ubiti tumorske stanice pri izravnom dodiru, ali bez prethodne senzibilizacije. Nakon što se pričvrsti uz tumorsku stanicu, stanica NK otpušta neke topljive čimbenike koji uzrokuju njezinu lizu. Stanica NK se može odvojiti od ubijene tumorske stanice i za nekoliko sati uspješno napasti novu tumorsku stanicu. Brojne su tvari koje potiču aktivnost NK stanica.

Makrofagi i monociti su aktivni sudionici imunoreakcije na tumore. Protutumorska aktivnost makrofaga se temelji na litičkim enzimima i metabolitima reaktivnog kisika i dušikova oksida. Aktivirani makrofag luči citokin koji djeluje izravno protutumorski.

Humoralna imunost čini čitav spektar protutijela različitih razreda i podrazreda, koja u reakciji s površinskim tumorskim antigenima mogu u različitim uvjetima uzrokovati cijeli niz konačnih učinaka, od promjene stanične površine koja zaštićuje tumor. Protutijela mogu nakon vezanja s tumorskom stanicom učiniti ju podložnom lizi, posredovanjem stanica NK ili makrofagima (Andreis i sur. 2004).

#### **1.1.4 Karcinogeneza**

Za nastanak tumora potrebne su promjene u genima koje stanici daju nova biološka svojstva. Geni odgovorni za kontrolu staničnog ciklusa jesu protoonkogeni i tumor-supresorski geni. Uzroci poremećaja tih gena su različiti, pa možemo govoriti o kemijskoj, fizikalnoj i biološkoj karcinogenezi.

##### **1.1.4.1 Kemijska karcinogeneza**

Kemijski su kancerogeni brojne egzogene i endogene tvari koje imaju sposobnost izazivanja zloćudne preobrazbe stanica. Učinak navedenih tvari može biti genotoksičan (kemijski oštećuju DNA) i negenotoksičan (ne oštećuju DNA, nego djeluju pojačavanjem djelovanja genotoksičnih tvari).

U egzogene se karcinogenike ubrajaju prirodni spojevi koji se nalaze u okolišu, proizvodi različitih organizama (npr. mikotoksini) te proizvodi industrijske proizvodnje. Pušenje je, epidemiološki gledano, najvažniji kancerogenik.

Najvažniji endogeni čimbenici su slobodni kisikovi radikali koji mogu oštetiti DNA. Nastaju u različitim fiziološkim i patofiziološkim procesima u organizmu, a egzogeni karcinogenici pospješuju njihov nastanak.

#### ***1.1.4.2 Mehanizam kemijske karcinogeneze***

##### **Inicijacija**

Karcinogeneza započinje čestim kemijskim oštećenjem molekule DNA. Normalna stanica putem nekoliko sustava popravaka oštećenja odstranjuje oštećenu DNA, a ako oštećenja izbjegnu mehanizme popravka, nastaje mutacija. Taj početni, ireverzibilni korak u nastanku tumora naziva se inicijacijom (Šamija i sur. 2006).

Međureakcija između inicirajuće tvari i staničnog DNK dovodi do nastajanja kromosomalne i/ili DNK promjena; nepopravljene pogreške prije diobe, dovodi do trajnog oštećenja (mutacije). Unatoč činjenici da inicijacija uključuje stvaranje mutacija, ovaj proces nije dovoljan sam po sebi za nastanak tumora. Ovisno o lokalizaciji mutacije u genomu, novonastala stanica posjeduje potencijal izrastanja u malignu neoplazmu. Inicirane stanice mogu ostati neaktivne duže vrijeme dok ne dobiju odgovarajući promotivni podražaj (Grabarević, 2002).

##### **Promocija**

Promocija može slijedeći inicijaciju uzrokovati tumor, ali sam po sebi nije tumorogena. Abnormalnosti koje su nastale u stanici nakon izlaganja karcinogenicima neće uzrokovati progresiju u tumor ako se ne uključe dodatni čimbenici. Takvi dodatni čimbenici se nazivaju promotorima, tvarima koje nemaju kancerogeni učinak, ali potiču djelovanje kancerogenika. Oni skraćuju vrijeme od početka djelovanja kancerogenika do pojave zloćudne preobrazbe tj. vrijeme latencije. Učinak promotora je reverzibilan, nije genotoksičan te se očituje u poticanju sinteze DNA i množenja stanica. Kao promotori djeluju hormoni ili dim cigarete (Šamija i sur. 2006).

## Progresija

Progresija je zadnji i konačni stupanj višestupanjskog modela kancerogeneze. Sastoji se od postupne evolucije stanica raka u kojem one postaju progresivno sve malignije. Progresija je krajnji rezultat genske nestabilnosti koja karakterizira neoplastične stanice.

Ova genska nestabilnost dovodi do visokog stupnja spontanijh mutacija tijekom ekspanzije od jedne izvorne stanice. Unatoč činjenici da su neoplazme monoklonalnog izvora tijekom vremena one postanu heterogene (Grabarević, 2006).

### *1.1.4.3 Fizikalna karcinogeneza*

U fizikalne čimbenike karcinogeneze ubrajaju se elektromagnetski valovi različite frekvencije koji u stanici dovode do ionizacije i oštećenja DNK. Fizikalnu karcinogenezu prouzrokuje ionizirajuće i ultraljubičasto zračenje. Izvori zračenja mogu biti prirodni (iz Svemira, UV-zračenje, Sunčeva svjetlost, radioaktivni izotopi iz tla i vode).

U ionizirajuće zračenje ubrajaju se  $\alpha$  i gama zrake te čestično zračenje. U stanici izloženoj ioniziranom zračenju dolazi do kratkotrajnih promjena na razini atoma i molekula, biokemijskih promjena te do konačnih, morfoloških oštećenja stanice.

Štetni učinci u stanici nastaju bilo izravnim lomovima i modifikacijama makromolekula ili posrednim učincima putem stvorenih slobodnih radikala, a očituju se kao genske i/ili kromosomske promjene.

Smatra se da su UVB – zrake odgovorene za nastanak kožnih karcinoma.

### *1.1.4.4 Biološka karcinogeneza*

Mnogi virusi sudjeluju kao aktivacijski čimbenici u patogenezi slobodnih tumora. Tumorski virusi uzrokuju transformaciju stanice zahvaljujući sposobnosti integracije vlastitog genoma u genom domaćina. Postoje DNA i RNA virusi. Kod DNA virusa ulazak u stanicu domaćina praćen je transkripcijom virusne DNA u mRNA, te translacijom u virusne proteine. Stanična i virusna DNA repliciraju se prije dijeljenja stanice, te se tako virusni genom integrira u genom domaćina.

Kod RNA virusa nije moguća izravan integracija u genom domaćina, sve dok se virusna RNA ne konvertira u kopiju DNA, koja se zove provirus. Enzimi koji posreduju tu konverziju naziva se reverzna transkriptaza. Provirus se zatim integrira u genom domaćina i replicira zajedno s njim. RNA virusi koji se tako ponašaju nazivaju se retrovirusi. Tumori nastali putem virusne infekcije razvit će se u jednog od tisuću zaraženih virusom, a vrijeme latencije iznosi 20 do 50 godina (Šamija i sur. 2006).

Članovi nekoliko porodica životinjski virusa tj. tumorski virusi mogu izravno izazvati rak. U viruse koji uzrokuju rak ljudi spadaju hepatitis B i C, papilomavirus, Epsteine-Barrov virus. HIV neizravno uzrokuje slučajeve raka koji nastaju zbog imunodeficijencije (Hausmann i Cooper, 2004).

### 1.1.5 Širenje raka

Većina karcinoma počinje rasti kao lokalizirane proliferacije epitela iz kojega su nastali. Dokle god ne penetriraju kroz bazalnu membranu, oni na tome mjestu ostaju kao karcinomi *in situ*. U ovoj fazi, gotovo su svi karcinomi izlječivi, ali kako su poremećaji zdravlja uzrokovani ovakvim tumorom neznatni, to su i klinički simptomi vrlo oskudni te stoga ostaju nedijagnosticirani (Grabarević, 2002).

#### 1.1.5.1 Invazivnost

Da bi tumorske stanice ušle u krvotok ili u limfotok moraju najprije napustiti vlastiti tkivni odjeljak i prijeći bazalnu membranu. Prodor tumora u susjedna tkiva i u izvanstaničnu stromu, koji prethodi metastaziranju naziva se invazijom. Važnu ulogu u tumorskoj invaziji ima poremećaj u vezama između tumorskih stanica te između tumorskih stanica i izvanstanične strome.

Metastatski potencijal tumora u korelaciji je s promjenom u ekspresiji kadherina (molekula koje omogućuju međustanične veze) i integrina (molekula koje omogućuju veze između stanica i izvanstanične strome). Prodor kroz bazalnu membranu temelji se na aktivnoj enzimskoj razgradnji i tlaku rastućeg tumora. Za tumorsku invaziju bitni su i inhibitori tih enzima te ravnoteža u koncentraciji i aktivnosti enzima i njihovih inhibitora (Šamija i sur. 2006).

Istraživanja pokazuju da tumorske stanice, u usporedbi prema normalnim stanicama, mogu imati promijenjena adhezivna svojstva, odnosno profil ekspresije adhezivnih receptora i/ili liganda. Protutijelima ili peptidima (ligandima) protiv adhezijskih molekula na tumorskim stanicama može se spriječiti ili omesti njihova invazivnost i sposobnost metastaziranja.

Međureakcija tumorskih stanica s bazalnom membranom temelji se na pričvršćenju tumorskih stanica za bazalnu membranu, u razgradnji bazalne membrane i u prolazu tumorskih stanica kroz bazalnu membranu. Nakon prolaska kroz bazalnu membranu može doći do ulaska tumorskih stanica u cirkulaciju i limfotok (Šamija i sur. 2000).



### ***1.1.5.2 Nastanak metastaza***

Metastaziranje je prijenos tumorskih stanica iz jednog dijela tijela u drugi dio koji s njime nije izravno povezan. Kod tumora metastaziranje nastaje prijenosom tumorskih stanica krvlju i limfom. Metastaziranje tumora otežava liječenje te prouzrokuje smrt onkoloških bolesnika. Sam ulazak tumorskih stanica u krvnu žilu ne znači nužno da će se razviti metastaza. Procjenjuje se da samo 0,001% cirkulirajućih tumorskih stanica stvori metastazu. Dio tumorskih stanica umre u cirkulaciji zbog turbulencije krvnog tijeka ili ih uništi imunološki sustav. Tumorske stanice lakše prežive u cirkulaciji ako se stvore nakupine koje mogu biti sastavljene tumorskih stanica (homoagregati) ili od tumorskih stanica i normalnih stanica (heteroagregati) prisutnih u cirkulaciji (trombocita i limfocita).

Pri zaustavljanju tumorskih stanica na mjestu gdje će izaći iz kapilare i stvoriti metastazu važnu ulogu imaju adhezijske molekule na tumorskim stanicama i kapilarama stijenki. Sam izlazak tumorskih stanica iz krvotoka zbiva se slično kao i njihov ulazak u krvotok.

Metastazu će razvit samo najmalignije tumorske stanice, tj. stanice koje mogu preživjeti sve faze metastatskog procesa: prodor kroz membranu, ulazak u krvnu žilu, preživljenje u krvotoku, izlaz iz krvne žile i započinjanje diobe kojom konačno nastaje sama metastaza (Šamija i sur. 2006).

### ***1.1.5.3 Angiogeneza***

Angienezom nastaju krvne žile u koje ulaze tumorske stanice u procesu metastaziranja, a angiogeneza je važna i za razvoj i rast novonastalih metastaza. Ona označava stvaranje novih krvnih žila iz već postojećih. Bez vlastitog sustava krvnih žila tumor može narasti do promjera 0,2 do 2 mm, ovisno o vrsti tumora. Do te veličine tumor se može opskrbljivati potrebnim hranjivim tvarima i kisikom putem difuzije. Ako ne dođe do angiogeneze, tumor prestaje rasti i ostaje u „mirujućem“ stanju. Važno je naglasiti da i u mirujućem stanju dolazi do diobe tumorskih stanica i proliferacije, samo što je proliferacija uravnotežena odumiranjem tumorskih stanica apoptozom i nekrozom.

Angiogeneza započinje razgradnjom bazalne membrane kapilara, nakon čega se iz postojećih kapilara formiraju izdanci endotelnih stanica koje se brzo dijele i prodiru u izvanstaničnu stromu. Poslije se iz izdanka počinju formirati cijevi koje se na vrhovima međusobno spajaju u petlju, što omogućuje uspostavljanje krvotoka.

Tumorska je angiogeneza složen aktivni proces u kojem sudjeluju tumorske stanice, endotelne stanice krvnih žila i neke druge stanice (makrofagi, fibroblasti).

Sve te stanice stvaraju različite čimbenike koji potiču ili koče angiogenezu i sama angiogeneza ovisi o ravnoteži tih čimbenika (Šamija i sur. 2006).

### **1.1.6 Liječenje tumora**

U kliničkoj onkologiji tj. liječenju tumora najbitnija je pravodobna dijagnoza; otkriće raka u što ranijem stadiju. Temelji dijagnostičkog postupka su anamneza i fizikalni pregled. Nakon toga liječnik poduzima daljnje pretrage da bi potvrdio ili isključio dijagnozu te utvrdio stupanj anatomske proširenosti i stanje bolesnika.

U liječenju tumora danas se koriste razne metode kao što su kirurško liječenje, radioterapija, sistemska terapija (kemoterapija, imunoterapija, hormonska terapija), laserska ili fotodinamična terapija, hipertermija te gensko liječenje ili njihova kombinacija.

### **Kirurška onkologija**

Kirurško uklanjanje malignog tumora je najstariji način liječenja raka. Osim terapijske uloge ima još preventivsku, dijagnostičku, potpornu i rehabilitacijsku ulogu u onkologiji.

Kirurški zahvat podrazumijeva kirurško odstranjivanje primarnog tumora s dostatno širokim rubom zdravog tkiva te često i uklanjanje regionalnih limfnih čvorova da rak ne bi zahvatio limfne čvorove te se proširio limfnim sustavom.

### **Radioterapija**

Radioterapiju možemo definirati kao vrstu liječenja tumora i drugih bolesti u kojemu se terapijski učinak postiže ionizantnim zračenjem. Temelji se na uporabi zračenja visoke energije s namjerom da uništi zloćudne stanice i zaustavi rast tumora. Na nekim mjestima je moguće zračenjem kao jedinim oblikom liječenja izbjeći operacije ili neoperabilne tumore učiniti operabilnima. Može se koristiti radi uklanjanja boli, krvarenja i neuroloških smetnji prouzročenim područnim rastom tumora te metastazama.

### **Laserska terapija**

Ona omogućuje intervencije na vrlo malim operacijskim poljima, u uskim otvorima, što nije moguće klasičnim instrumentima. Laser ne dodiruje biološko tkivo, koagulacija u operacijskom polju je beskrvna te nema infekcije jer je postupak sterilan. Cijeljenje tkiva je brzo i bez ožiljka, nema edema niti boli.

**Fotodinamička terapija**

Ona je jedan od oblika specifične onkološke terapije koja počiva na fotoosjetljivosti tumorskih stanica u kojima se selektivno nakuplja fotosenzibilizator. U svakodnevnoj kliničkoj praksi se rijetko koristi.

**Gensko liječenje tumora**

Ono se temelji na unosu genskog materijala u stanicu bolesnika. Još se ne primjenjuje rutinski, ali su istraživanja pokazala obećavajuće rezultate. Mora se voditi računa o nuspojavama kao primjerice o izazivanju imunološke reakcije u bolesnika.

**Hipertermija**

Označava vrstu liječenja u onkologiji zbog dokazanog pozitivnog učinka povišene tjelesne temperature u liječenju maligne bolesti. Najbolji se rezultati pokazuju primjenom hipertermije s kemoterapijom ili radioterapijom (sinergistički učinak).

**Sistemska terapija**

U sistemska terapiju ubrajamo *kemoterapiju*, *imunoterapiju* i *hormonsku terapiju*. Kemoterapija predstavlja glavni terapijski postupak iako je nespecifična i toksična.

Zloćudna bolest je najčešće u trenutku dijagnosticiranja već raširena, sistemska bolest.

Da bi se postigli što bolji rezultati, nužno je primijeniti sistemska liječenje tj. primijeniti neko ljekovito sredstvo na takav način da dosegne svaku zloćudnu stanicu u kojem god se dijelu organizma ona nalazila. To znači dati bolesniku kemijsku ljekovitu tvar na način da ona cirkulacijom bude raznesena po čitavom organizmu.

**Hormonska terapija**

Hormonska terapija se koristi u liječenju tumora koji nastaju iz hormonski ovisnih tkiva (rak dojke, endometrija, prostate). Ima veliku učinkovitost i malu toksičnost.

**Kemoterapija**

Kemoterapija je liječenje raka kemijskim sredstvima tj. citostaticima koji uništavaju zloćudne stanice. Citostatici uništavaju zloćudne stanice kočeći njihov rast i diobu. Ti lijekovi ne djeluju selektivno tj. isključivo na zloćudne stanice te mogu oštetiti i zdrave stanice u tijelu.

Zbog neselektivnog djelovanja kemoterapija ima i neželjene posljedice poput mučnine i povraćanja, ispadanja kose, alergijske reakcije, oštećenje funkcija spolnih žlijezda te srčana, plućna, bubrežna i neurološka toksičnost.

Uporabom odgovarajućih zaštitnih sredstava dobar dio neželjenih posljedica se može spriječiti ili minimalizirati. Uobičajena primjena citostatika je intravenski, intramuskularno ili preoralno. Postoje i posebni načini primjene citostatika poput instilacije u spinalnu tekućinu. Svrha direktne primjene citostatika je postizanje što većeg djelovanja na ciljnu tumorsku masu uz istodobnu poštedu normalnog tkiva. Mogu se primjenjivati pojedinačno ili u kombinaciji.

Kemoterapija se koristi nakon provedenog lokalnog liječenja (operacije) i cilj joj je uništiti moguća mikrometastatska žarišta bolesti. Može se koristiti kod uznapredovale bolesti da bi došlo do sniženja stadija bolesti i učinilo je operabilnom.

### **Imunoterapija (Bioterapija)**

Imunoterapija se temelji na mogućnosti modulacije imunosnog sustava te je moguće zloćudni tumor izliječiti pojačanjem ili usmjerenjem imunosne reakcije, to jest stvoriti specifičnu imunost protiv tumora, odnosno tumorskih antigena. Ljudski imunosni sustav nije tako lako modulirati i premda je moguće potaknuti i staničnu i humoralnu imunosnu reakciju protiv zloćudnog tumora, danas imunoreaktivnim mehanizmima još nije moguće izliječiti zloćudnu bolest. Razlozi tomu su višestruki, a najvažniji od njih je vrlo varijabilna antigenska struktura i slaba imunogeničnost tumora (M.Šamija i sur. 2002.).

Imunoreakcija nije dovoljno snažna da uvjetuje regresiju već uznapredovalo tumora, ali može pomoći u eliminaciji manjeg broja tumorskih stanica preostalih nakon primjene standardnih načina liječenja tumora.

Razvojem molekularne genetike otvorile su se mogućnosti izolacije i karakterizacije tumorskih antigena i njihove uporabe u liječenju i prevenciji bolesti (Andreis i sur. 2004).

Postoji nekoliko tipova imunoterapije:

### **Pasivna imunoterapija**

Pasivna se imunoterapija tumora osniva na prijenosu specifičnih protutumorskih protutijela, priređenih u drugom organizmu iste ili različite vrste.

Mehanizam djelovanja antiseruma uglavnom je izravna citotoksičnost uperena protiv tumorskih stanica, ali se može protutijelima, kao specifičnim nosačima, uvesti selektivno u tumorske stanice neki toksin, citostatik ili radioaktivni izotop.

Osnovni problem pri ovom terapijskom pristupu je taj što svi tumori nemaju iste antigene, a također su im neki antigeni zajednički sa zdravim stanicama. Također tumorski antigeni u cirkulaciji mogu neutralizirati primijenjena protutijela.

### **Adoptivna imunoterapija**

Prijenos senzibiliziranih limfocitnih stanica (primjerice, koštane srži, slezene, limfnog čvora) može zaštititi životinje od tumorskog presatka ili, rjeđe, izazvati regresiju već uspostavljenog tumora, a češće usporenje njegova rasta. Transfuzija limfocita imuniziranih bolesnika dovela je katkad do prolaznih regresija njihovih tumora.

### **Specifična aktivna imunoterapija**

Aktivna imunizacija bolesnika može se provesti antigenima vlastitog tumora. Vlastite tumorske stanice se prethodno ubiju zračenjem, toplinom i sl., a zatim se same ili s nekim adjuvansom ubrizgaju bolesniku. Postoji opasnost od narastanja umjetne metastaze. Ovaj terapijski postupak se rijetko primjenjuje, a rezultati dobiveni kliničkom primjenom još su prilično kontroverzni.

### **Nespecifična aktivna imunoterapija**

Postoje nespecifični imunomodulatori (npr. glukan, zimozan, levaimsol) koji povećavaju broj i aktivnost imunokompetentnih stanica. Aktiviraju makrofage koji pojačano izlučuju različite citokinine te aktiviraju pomagačke limfocite i pojačavaju staničnu i humoralnu imunost.

### **Restorativna imunoterapija**

Ovim terapijom pokušava se obnoviti nedostatna imunosna reakcija te se upotrebljavaju antagonisti supresijskih utjecaja (Andreis i sur. 2004).

## 1.2 Propolis

Terapeutske karakteristike propolisa su dobro poznate već dugo vremena. Korišten je u antici, posebno u Egiptu gdje su ga koristili za balzamiranje mrtvih. Više od petnaest grčkih i rimskih autora piše o pripravljanu i primjeni takozvanog trećeg prirodnog proizvoda pčela (uz med i vosak). Aristotel je ispravno opisao osnovna pitanja njegove biologije u „Historia Animalium“ te zaključuje da se može koristiti u liječenju kožnih povreda, rana i infekcija. Hipokrat je koristio propolis u liječenju čireva na koži i u probavnom sustavu. Velika upotreba propolisa zabilježena je za vrijeme Burskih ratova u Južnoj Africi (1899-1902), jer je pokazao odlične rezultate u zacjeljivanju rana. U narodnoj medicini se koristi kao mast u liječenju nekih bolesti.

Propolis je najvažnije pčelinje "kemijsko oruđe" za borbu protiv patogenih mikroorganizama, a ljudi ga koriste kao ljekovito sredstvo od antički vremena. Zbog tog razloga propolis je postao subjekt intenzivnih farmakoloških i kemijskih istraživanja zadnjih 30 godina (Banokva, 2005).

### 1.2.1. Što je propolis i kako nastaje ?

Pčele kao vrsta na Zemlji postoje već 125 milijuna godina i rasprostranjene su na svim kopnenim staništima. Njihovoj uspješnoj evolucijskoj prilagodbi doprinosi čitav niz specifičnih proizvoda koje proizvode: med, vosak, pčelinji otrov, propolis, polen i matična mliječ (Bankova, 2005).

Propolis (pčelinje ljepilo) je generičko ime za smolastu tvar koju sakupljaju pčele s različitih biljnih vrsta. To je smola, tamno zelene ili smeđe boje, sa finim okusom meda, voska ili vanilije, ali može imati i gorki okus. Ime mu potječe od grčkih riječi  $\pi\rho o$  (pro) – za, i  $\pi o\lambda\iota s$  (polis) – grad, što doslovno znači „za obranu grada“ (Ghisalberti, 1979).

Za proizvodnju propolisa pčele koriste materijal proizveden različitim biljnim procesima, u različitim dijelovima biljaka. To su tvari koje aktivno luče biljke, ali mogu biti izlučene iz biljnih rana, a to su: lipofilni materijal na listovima i lisnim pupoljcima, guma, smole, lateks itd.

Pčele svojim organima usnog aparata izvlače smole u dugu nit dok se ona ne otkine. One ne sakupljaju propolis samo mehanički već imaju utjecaj i na njegov sastav. Razlog tome je sekrecija enzima ( $\beta$  glikozidaze) iz mandibularnih žlijezdi. Taj enzim dovodi do hidrolize glikozida flavonoida u smoli do slobodnih aglikana u propolisu.

Ta enzimatska promjena propolisa ima utjecaj na biološku aktivnost (Oršolić, 2006). Zatim, nožicama spremaju propolis u košarice zadnjeg para nogu gdje se nalazi i pelud. Jedna pčela jednokratno donese oko 10 miligrama propolisa, dok se u sezoni po košnici skupi 100 do 150 grama.

Propolisom pčele iznutra oblažu košnicu i zatvaraju pukotine i rupe te poliraju stanice saća. Kada u košnicu uđe miš, leptir ili neka druga životinja pčele ju ubiju, ali je ne mogu iznijeti iz košnice, pa ju oblažu slojem propolisa i time sprječavaju njeno raspadanje i širenje zaraze. Zimi ga koriste za smanjivanje veličine ulaza u košnicu.

### **1.2.2. Kemijska i fizikalna svojstva propolisa**

Kako je pčelinje lijepilo biljni proizvod, njegov kemijski sastav ovisi o specifičnosti lokalne flore na mjestu sakupljanja te na taj način o geografskim i klimatskim karakteristikama te lokacije. Zbog tih razloga, kemijski sastava propolisa značajno varira u različitim regijama. Oko 1960–tih, smatralo se da je propolis kompleksan, ali manje-više konstantnog sastava (kao pčelinji vosak ili otrov) (Lindensfeler, 1967). Međutim, novija istraživanja i analize uzoraka sa različitih geografskih regija, dovode do zaključaka da je kemijski sastav propolisa jako varijabilan. Mnoge analitičke metode su korištene za izdvajanje i otkrivanje pojedinih sastavnica propolisa (Maruci 1995).

Propolis je ekstremno složena mješavina prirodnih spojeva, a sastoji se od voska, masnih kiselina, flavonoida, terpena, cinaminske kiseline i estera. Sadrži oko 55% smola i balzama, 30% voskova, 10% eteričnih ulja i 5% pelud. Do sad je otkriveno više od 300 sastojaka, 22 minerala i 7 vitamina.

Utvrđena je prisutnost vitamina (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, nikotinska kiselina, pantotenska kiselina), minerala (Na, K, Mg, Ca, Ba, Sr, Zn, Cd, Al, Si, Pb, Fe, Ni, Cr, Mn, Ag, Cu, Co, Mo, V, P, S, Cl, F, At, Ni, Hg) i aminokiselina (Ser, Gly, Asp, Glu, Ala, Trp, Leu Cis, Lys, His, Arg, Pro, Tyr, Met, Val) (Bankova i sur. 2002).

U sastavu propolisa su najbrojniji flavonoidi (35-50%), koji su uz fenole i aromatske spojeve, farmakološki najvažnije aktivne sastavnice. Oni predstavljaju osnovu biološke aktivnosti propolisa.

To su biljni pigmenti koji se u najvećoj koncentraciji nalaze na pupovima biljaka te ih štite od nametnika i niskih temperatura.

Od flavonoida u propolisu nalazimo: kamferol, naringenin, kafeinska kiselinu, krizin, pinocenbrin, apigenin i galangin. Do sada je u propolisu nađeno 38 vrsta flavonoida, a u uzrocima s područja Hrvatske, najzastupljeniji je pinocenbrin.

Oni imaju dvije uloge: poticanje temeljnih metaboličkih procesa te zaštitnu ulogu.

Boja propolisa varira od žuto-zelene do tamno smeđe, ovisno o izvoru i starosti. Intenzivan, aromatičan miris mijenja se ovisno o prisutnosti raznih smola. Isto vrijedi i za okus, koji varira od gorkog do gotovo slatkog.

Pri temperaturi od 30 °C propolis je mekan i ljepljiv, a ispod 15 °C čvrste je konzistencije, te mu točka topljenja varira ovisno o udjelu određenih sastavnica, od 65 °C do 70 °C.

Slabo se otapa u vodi (7% do 11%), dok topljivost u etilnom alkoholu varira od 50% do 80% ovisno o temperaturi.

### **1.2.3. Biološka svojstva propolisa**

Propolis ima antibakterijsko, antivirusno, antimikotičko, lokalno anestetičko i protuupalno djelovanje, pojačava aktivnost nekih antibiotika, djeluje kao biostimulator, a potiče i obnavljanje tkiva.

### **Imunomodulacijski učinak**

Propolis pojačava imunološke mehanizme za proizvodnju specifičnih i nespecifičnih obrambenih tvari kojima se suprotstavlja uzročniku bolesti i sprječava njezino napredovanje, neovisno o urođenim i stečenim imunološkim kapacitetima. Takav učinak zove se imunomodulacijsko ili imunoregulacijsko djelovanje, a popularno kao jačanje imunološkog sustava.

Imunomodulatori su sredstva čiji mehanizmi reakcije uključuju modulaciju vlastitog biološkog odgovora jedinke. Koriste se u liječenju tumora te otvaraju mogućnost modificiranja odnosa između tumora i njegovog domaćina i mijenjaju odgovor domaćina prema tumoru s pozitivnim učinkom za domaćina.

Danas se korištenje propolisa kao imunomodulatora smatra alternativom za prevenciju i liječenje nekoliko bolesti (Oršolić i Bašić, 2003).

Kao imunomodulator, djeluje potičući ili inhibirajući neke događaje u imunološkom odgovoru. Ti kontradiktorni učinci prouzrokovani su kemijskom kompleksnošću propolisa.

Jedan od mehanizam imunomodulacije propolisa je djelovanje na makrofage.



To su stanice imunskog sustava koje imaju važnu ulogu u obrani organizma kroz fagocitozu, stvaranjem slobodnih radikla, izlučivanjem različitih biokemijskih tvari i dr. Propolis povećava aktivnost makrofaga. Također može direktno ili indirektno povećat aktivnost stanica NK.

### **Antitumorski učinak**

Kod tumorskih bolesti potiče imunološki sustav na pojačanu aktivnost NK-stanica i drugih specifičnih i nespecifičnih obrambenih tvari, a istovremeno pokreće mehanizam smrti tumorskih stanica. Njegova antimetastatska svojstva također su vezana za imunološku aktivnost.

Flavonoidi u propolisu imaju snažna antioksidacijska svojstva kojima se pripisuje dokazani kemopreventivni, odnosno zaštitni učinak od pojave tumora dojke, debelog crijeva, bubrega, jetre, maternice, želuca, pluća, kože i krvi. Također pokazuje značajan protutumorski učinak na karcinom mliječne žlijezde i sprječava pojavu metastaza na plućima u miševa.

U kombinaciji s citostaticima učinkovitije smanjuje napredovanje karcinoma i metastaziranje, a nuspojave kod kemoterapije su znatno blaže. Oporavak krvnih stanica je puno brži.

Propolis štiti bubrege od akutnog oštećenja koje izazivaju neki citostatici, primjerice cisplatina (Radić, 2007).

Kemopreventivna djelatnost propolisa i flavonoida, na životinjskim modelima i stanicama kulture, se pokazala kao rezultat njihove sposobnosti da inhibiraju sintezu DNA u tumorskim stanicama, induciraju apoptozu tumorskih stanica i da aktiviraju makrofage da proizvode faktore koji reguliraju funkciju B-, T- i NK- stanica.

Ta istraživanja pokazuju da propolis i pripadajući flavonoidi mogu povećati antitumorsku aktivnost u kemoterapiji te smanjiti citotoksičnost imunokompetentnih stanica (Oršolić i sur. 2008).

*Karcinom trbušne šupljine.* U kombinaciji s citostaticima značajno smanjuje napredovanje karcinoma trbušne šupljine, a nuspojave kod kemoterapije su znatno blaže. Oporavak bijelih i crvenih krvnih zrnaca je znatno brži.

*Karcinom pluća.* Smanjuje rizik od nastajanja tumora i metastaziranja na plućima. Kombinacija s citostatikom je učinkovitija od samog citostatika u sprječavanju metastaza.

*Karcinom debelog crijeva.* Sprječava pojavu tumora na debelom crijevu. Kod već nastalog karcinoma, usporava njegov rast i smanjuje rizik od metastaziranja na jetri.

*Karcinom dojke.* Smanjuje napredovanje karcinoma dojke tako da sprječava razmnožavanje njegovih stanica i pokreće mehanizam apoptoze, odnosno programiranu smrt tumorskih stanica.

*Leukemija.* Na modelu ljudskih leukemijskih stanica (HL-60) utvrđeno je da propolis ubija stanice tumora (Radić 2007).

### **Antioksidacijski učinak**

Antioksidativni učinak propolisa većim dijelom potječe od visokog sadržaja flavonoida. Glavni flavonoidi su: galangin, isalpinin, kamferol, ramnocitrin, ramnetin, kvercetin. Antioksidacijskim svojstvom se sprječavaju i učinkovito odstranjuju slobodni radikali kojima se pripisuju pojave raznih bolesti, kao što su tumori, srčanožilne bolesti, bolesti živčanog sustava, mrena, emfizem, ubrzano starenje i dr.

Istraživanja provedena u Institutu pomorske medicine HRM u Splitu su pokazala da hrvatski propolis ima jači antioksidacijski učinak od vitamina C i E i nekih sintetskih antioksidansa.

*Mrena.* Sprječava pojavu mreke i poboljšava antioksidacijsku obranu krvi i leće te štiti rožnicu od posljedica kemijske povrede.

*Moždani udar.* Zajedno s peludom kod moždanog udara podiže antioksidacijsku obranu i opskrbu mozga krvlju što omogućava brži oporavak poremećenih i izgubljenih funkcija.

*Bubrezi.* Antioksidacijskim učinkom štiti bubrege od akutnog oštećenja koje izazivaju neki citostatici (cisplatin) za vrijeme kemoterapije.

*Jetra.* Čuva jetru od nekih kemijskih otrova i alkohola što se pripisuje njenoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Zaštitni učinak je jači od poznate tvari glicirizina.

*Srce.* Štiti srce od toksičnih tvari koji slobodnim radikalima oštećuju srčano tkivo.

*Zračenje.* Preživljavanje miševa nakon gama zračenja pripisuje se antioksidacijskim svojstvima propolisa i upućuje na njegov zaštitni potencijal od slobodnih radikala nastalih raznim vrstama zračenja.

*Alkohol.* Štiti želudac od oštećenja alkoholom.

**Antibakterijski učinak.** Antibakterijsko djelovanje propolisa jače je izraženo na gram-pozitivne bakterije (streptokok, stafilokok), nego na gram-negativne mikrobe (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Antibakterijska aktivnost propolisa je prouzrokovana flavonoidima, aromatskim kiselinama i esterima prisutnim u smoli. Galangin, pinocembrin i pinostrobin su prepoznati kao najučinkovitiji spojevi protiv bakterija (Maruci 1995).

Mehanizam antibakterijskog djelovanja je kompliciran i može biti posljedica sinergizma flavonoida, hidroksiacida i seskiterpena.

U slučaju kada izravno ne djeluje na gram-negativne bakterije, u organizmu stvara zaštitu od upale koje one prouzrokuju (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*). Učinak mu je slabiji od antibiotika, ali je manje toksičan, ne izaziva rezistenciju i ne oštećuje normalnu crijevnu floru. Kada se uzima zajedno s nekim antibioticima, vrijeme ozdravljenja je znatno kraće.

**Antivirusni učinak.** Sprječava razmnožavanje nekih virusa, uzročnika bolesti u ljudi (*Herpes simplex*, *genitalis* i *zoster*, gripe i velikih boginja). Klinička ispitivanja su pokazala da je vrijeme ozdravljenja kod obične prehlade 2,5 puta kraće kada se koristi propolis. Flavonoidi i derivati aromatskih kiselina pokazuju antivirusnu aktivnost (Marucci 1995).

**Antigljivični učinak.** Djeluje na različite vrste gljivica, uglavnom uzročnika bolesti kože i kose.

**Antiparazitna svojstva.** Zaustavlja rast jednostaničnih parazita *Trichomonas vaginalis*, uzročnika upale spolnih organa u žena i mokraćovoda kod muškaraca. Djeluje također i na *Trypanosoma cruzi*.

**Antiupalna svojstva.** Snažno protuupalno djelovanje izraženo je kod akutnih i kroničnih upala. Zanimljivo je da djeluje i na upale koje nisu izazvane infekcijama (opekline od sunca, vatre, zračenja i kemijskih tvari).

**Anestetička svojstva.** Ima potpuni lokalni anestetički učinak kao lidokain, a jači od kokaina i prokaina. Djelovanje protiv bolova pokazuje i kada se unosi u organizam.

**Zacjeljivanje rana.** Ubrzava zarastanje rana, ne samo kada se lokalno primjenjuje, nego i kada se unosi u organizam.

**Antialergijska svojstva.** Blokira oslobađanje histamina što ukazuje na njegovo antialergijsko djelovanje.

**Toksičnost.** Propolis nije štetan za ljude.

**Zamor.** Sprječava zamor i povećava tjelesnu izdržljivost.

**Alergijske reakcije.** Neki ljudi su osjetljivi na propolis. Alergija se očituje crvenilom na mjestu doticaja (Radić, 2007).

Također su opisana i mnoga druga biološka i farmakološka svojstva propolisa uključujući regeneraciju hrskavičnog tkiva, koštanog tkiva i zubne pulpe, pomaže u detoksifikaciji jetre, sprječava karijes, štiti od gama zračenja. Koristi se za liječenje osteoartritisa, očnih bolesti te u ortopedskim obradama.

### 1.3 Citostatici

Uspješna primjena citostatika u bolesnika sa zloćudnim tumorima zahtijeva visok stupanj kliničko – farmakološkog znanja jer je granica između terapijske doze i toksičnosti ili letalne doze vrlo uska. U svakom pojedinačnom slučaju doza mora biti određena individualno tj. svaki bolesnik predstavlja poseban problem pri odabiru citostatika te je potrebno pronaći najbolju kombinaciju uzimajući u obzir saznanja za pojedine zloćudne bolesti.

Citostatici (antineoplastici) su sredstva koja uništavaju zloćudne stanice i sprječavaju tumorski rast. To je vrlo raznolika skupina lijekova koja je različita po podrijetlu, kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja.

Smatra se da se imunosni sustav čovjeka ili životinje može nositi s masom stanica novotvorine  $10^9$  (oko 1 g). Citostatici djeluju na stanice ubijajući određeni postotak stanica, a ne apsolutni broj. Dovoljno je da ostane i jedna stanica da se neoplazma ponovno razvije. Smatra se da za ponovno pojavljivanje tumora je potrebno oko  $10^4$  do  $10^5$  stanica sposobnih za dijeljenje.

Istodobna primjena kombinacije citostatika omogućuje postizanje maksimalne smrtnosti tumorskih stanica unutra toksične tolerantnosti za svaki citostatik, pokrivanje većeg područja rezistentnih stanica u heterogenim tumorskim stanicama te usporavanje ili preveniranje razvoja novih rezistentnih stanica. Svrha kombiniranja je postizanje sinergističkog učinka.

Citostatici se mogu primijeniti na više načina: venskim putem, preoralno, intraperitonealno, intraarterijski, intrapleuralno i dr.

Jedan od najvažnijih problema je odnos doze citostatika i djelotvornosti. Postotak stanica koje preživljavaju djelovanje citostatika ovisi o dozi; veća doza veći protutumorski učinak. Malim povećanjem doze postiže se uništenje znatno većeg postotka stanica.

Kod liječenja citostaticima dolazi do niza nuspojava posebice na stanice s brzom proliferacijom, primjerice dolazi do supresije koštane srži, gastrointestinalnih poremećaja, kožnih promjena te do oštećenja jetre, bubrega, pluća, središnjeg živčanog sustava i dr.

Citostatici se dijele u pet skupina: alkilirajuća sredstva, antimetaboliti, antitumorski antibiotici, biljni alkaloidi te skupina ostalih, različitih citostatika.

### **Alkilirajuća sredstva**

Skupina lijekova koja ima sposobnost stvaranja kovalentnih veza s nukleinskim kiselinama i direktne reakcije s DNK.

Alkilirajući reagensi imaju znatno veći učinak na stanice koje se brzo dijele jer je za uklanjanje nastalog oštećenja DNK pogođene stanice nemaju dovoljno vremena. Ako neoporavljene stanice uđu u fazu sinteze DNK u sljedećem ciklusu oštećenja postaju ireverzibilna.

Citotoksični učinak ove skupine spojeva vezan je uz njihovu interakciju s DNK pri čemu dolazi do inhibicije ili netočne replikacije DNK što uzrokuje mutaciju ili staničnu smrt.

Alkilirajuća sredstva su polifunkcionalni spojevi koji u fosfatnim, amino, hidroksilnim, sulfhidrilnim, karboksilnim i imidazolskim grupama vodikove atome zamjenjuje alkilnim radikalima. U neutralnim ili blago zakiseljenim medijima kao što su tjelesne tekućine ti spojevi ioniziraju, pozitivno nabijeni ioni vežu se na nuklearne proteine, a najčešće mjesto vezivanja je na N-7 poziciji gvanina. Alkilacija dovodi do raspada imidazolskog prstena gvanina, abnormalnog sparivanja baza, čvrstog kovalentnog vezivanja unutar istog ili između različitih lanaca DNK, depurinacije DNK, onemogućavanja replikacije DNK i transkripcije RNA, te uništenja funkcije nukleinskih kiselina.

Neki primjeri alkilirajućih sredstava su: ciklofosfamid, cisplatin, karboplatin, melfalan i drugi.

### **Antimetaboliti**

Antimetaboliti su citostatici strukturno slični s fiziološkim intermedijarnim proizvodima staničnih procesa te predstavljaju lažni supstrat za biokemijske reakcije inhibirajući rast tumorskih stanica ili pak vode reverzibilnom oštećenju. Njihova djelotvornost je utemeljena na strukturnoj, ali ne i funkcionalnoj sličnosti sa spojevima koji imaju važnu fiziološku ulogu. Oni u staničnim procesima zamjenjuju normalne metabolite i vežući se na važne enzime onemogućuju njihovu funkciju u sintezi nukleinskih kiselina ili budu ugrađeni u te makromolekule, primjerice DNK, dovodeći do nastanka nukleinskih kiselina s pogrešnim kodom, što onemogućuje daljnji rast stanice i dovodi do njezine smrti. Najviše se koriste analozi metabolita nukleinskih kiselina, purinskih i pirimidinskih baza (metotreksat, edatreksat, aminopterin, citarabin, 5-fluorouracil, floksouridin, 5-merkaptopurin, tiogvanin, pentostatin, kladribin i fludarabin)

### **Protutumorski antibiotici**

Skupina različitih spojeva dobivenih na način sličan dobivanju protubakterijskih antibiotika. Temeljni spojevi su proizvod kultura različitih gljivica *Streptomyces species* modificiranih na različite načine.

Mehanizam djelovanja temelji se na kočenju enzima topoizomeraze II, što sprječava popravak lomova DNK nastalih za vrijeme sinteze novih lanaca DNK i onemogućava odvajanje novih lanaca matične DNA. Toj skupini pripadaju: doksorubicin, epirubicin, idarubicin, bleomicin, mitomicin C, aktinomicin-D i dr.

### **Biljni alkaloidi**

Biljni alkaloidi su biljni proizvodi s citotoksičnim djelovanjem. Tu se ističu tri skupine lijekova: derivati *Vinca roseae* (vinkristin, vinblastin, vindenzin), skupina pipodofilotoksina (etopozid, tenipozid) te takseni. Alkaloidi vinkristin, vinblastin te njihovi derivati vindezin, vinorelbin i vinzolidin dobiveni su iz biljke *Vinca rosea*. Vezanjem na tubulin ovi lijekovi sprječavaju stvaranje diobenog vretena te zaustavljaju stanice u metafazi mitoze i u G<sub>2</sub>-fazi staničnog ciklusa. U drugom podrazredu su derivati podofilotoksina, iscrpci korijena sjevernoameričke biljke *Podophyllum peltatum* slične našoj žutiki. Epopodofilotoksinski preparati su etopozid i tenipozid.

Njihov mehanizam temelji se na kočenju enzima topoizomeraze II što onemogućava popravak lomova na lancima DNK nastalih za vrijeme sinteze novih lanaca DNK.

Treću skupini čine iscrpci kore ili iglice drveća iz porodice tisa (*Taxus*) a nazivaju se takseni. To su paklitaksel i docetaksel koji onemogućuju stvaranje diobenog vretena od tubulina. U četvrtoj skupini se nalaze semisintetički derivati kamptotekina, topotekan i irinotekan. Kamptotekin je iscrpak kineskog drveta *Camptotheca acuminata* a mehanizam djelovanja je kočenje enzima topoizomeraze I što onemogućava popravak lomova nastalih u pojedinačnim lancima DNK i RNK.

### **Ostali citostatici**

Ovoj skupini pripada veliki broj citostatika koji se ne može svrstati u nijednu od navedenih skupina. To su primjerice, dakarbazin, amsakrin, mitoksantron itd.

#### **1.3.1 Mehanizam djelovanja citostatika**

Neoplastične stanice dijele se brže od ostalih tjelesnih stanica te se brže obnavljaju, a izuzetak su stanice koštane srži, limfnog tkiva, epitela crijeva, dlačnih folikula i zametnog epitela. S obzirom da su navedene stanice vrlo osjetljive na citostatike najveći broj nuspojava liječenja pogađa te stanice. Zbog toga se provodi tzv. ciklična kemoterapija temeljena na primjeni citostatika tijekom određenog vremenskog razdoblja te vremenu oporavka stanica (najčešće tri ili četiri tjedna). U tom vremenu se brzo obnove oštećene stanice koštane srži, epitela crijeva i dr. dok stanice novotvorina imaju usporen proces oporavka.

Zloćudni tumori u početku rastu eksponencijalno, a zatim se njihov rast usporava i potrebno je sve više vremena za udvostručenje volumena; rast tumora usporava se progresivno s povećanjem novotvorine. Citotoksičnu terapiju zbog usporenog rasta stanica tumora manje je osjetljiva kod uznapredovalih novotvorina.

Dio stanica je u staničnom ciklusu neaktivan tj. izvan faze, a drugi dio prolazi kroz staničnu diobu (mitozu, mejozu). Međutim, one se mogu opet vratiti u ciklus i dijeliti. Također, dio stanica je diferenciran tj. čini određena tkiva i nakon nekog vremena odumire.

Ako je stanična populacija uravnotežena, ukupni broj stanica se ne mijenja. To znači da se od dvije stanice jedna dijeli, a jedna diferencira ili privremeno izlazi iz ciklusa.

Citotoksini ponajprije pogađaju stanice koje su u ciklusu pa ne ubijaju one „skrивene“ izvan ciklusa. Upravo će te stanice nakon „odmora“ u ciklusima liječenja proliferirati i ponovno početi graditi novotvorinu.

Upotrebljavajući citotoksine pokušava se ubiti zloćudne stanice koje su aktivne u ciklusu te zatim stanice koje su u mirovanju pa ih produženom terapijom “čekamo” da postanu aktivne u ciklusu. Također se može djelovati na stanice u određenoj fazi ciklusa što zahtijeva mnogo truda i znanja te je katkad teško primjenjivo u praksi (Grabarević, 2002).

### **1.3.2 Otpornost citostatika**

Otpornost je sposobnost tumorskih stanica da prežive djelovanje biološki aktivne količine citostatika. Uzroci zakazivanja citostatika mogu biti različiti. Možemo ih podijeliti u dvije skupine. To mogu biti skupni činitelji na razini čitavog organizma te su vezani uz način primjene, apsorpciju, raspodjelu, metabolizam, interakcije s drugim lijekovima i izlučivanje lijeka. Na te činitelje se može utjecati promjenom načina, doze ili rasporeda davanja lijeka. Koncentracija citostatika koja će doseći tumor i vrijeme u kojem će tumor biti izložen djelovanju citostatika ovisi i o anatomskim i patološkim činiteljima kao što su prokrvljenost samog tumora, toksičnost prema zdravom tkivu i dr.

Druga vrsta otpornosti je vezana uz pojedinu stanicu, ona je na staničnoj genskoj/biokemijskoj razini. Nju je mnogo teže nadvladati, u mnogim slučajevima nemoguće te se naziva „stalna otpornost“.

Tumori mogu biti otporni na citostatike prije izlaganja citostaticima (primarna otpornost) ili nakon izlaganja citostaticima (stečena otpornost). Najčešći mehanizam koji dovodi do otpornosti je smanjeno ili onemogućeno nakupljanje citostatika u stanici; stanično oštećenje postiže se djelotvornom koncentracijom citostatika u stanici. Drugi važni mehanizam je promijenjen metabolizam. Promjene u metabolizmu stanice su osobito važne za stjecanje otpornosti na antimetabolite.

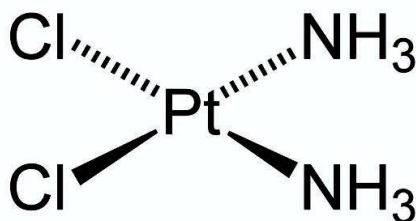
Danas se intenzivno istražuju promjene u ciljnim strukturama koje na taj način postaju otporne na citostatike. Važan način stjecanja otpornosti stanice je i pojačana sposobnost popravaka oštećenja DNK. Do oštećenja i pucanja DNK dovode mnogi citostatici, primjerice spojevi platine. Sam proces popravaka DNK i posljedične otpornosti na citostatike nije poznat u svim pojedinostima (Šamija i sur. 2000).

### **1.3.3 Cisplatina**

Cisplatina je učinkovito kemoterapeutsko sredstvo koje se koristi u liječenju širokog spektra tumora (Santos i sur. 2007).



Spada u skupinu alkilirajućih sredstava. Za nju se još koriste i drugi sinonimi poput cis-diamino-dikloroplatinum, cis-DDP, Platinol-AQ i dr.



Slika 1. Strukturna formula cisplatine

Za razliku od većine drugih citostatika koji su čisti organski spojevi, cisplatina je spoj metala platine cis konfiguracije, na koju su vezana četiri liganda (dva atoma klor i dvije molekule amonijaka). To je bijeli prašak vrlo teško topljiv u vodi (1:1000).

U plazmi je većinom kao neaktivna molekula, međutim, kada se nađe u okolini sa smanjenom koncentracijom klor (primjerice, intracelularno), otpušta svoja dva iona klor te postaje reaktivna, elektrofilna molekula. Disociranjem klor dolazi do stvaranja pozitivno nabijenih reaktivnih kompleksa koji se vežu na negativno nabijene nukleofilne dijelove molekule kao što je DNK te tvori bifunkcionalne kovalentne veze i nastaje DNK-platina kompleks. Nastaju promjene na DNK formaciji tj. vežući se na nju stvara intralančane i interlančane unakrsne veze što dovodi do lokalnog razaranja DNK lanaca te inhibicije DNK sinteze zbog nemogućnost popravaka nastalih oštećenja. Naposljetku dolazi i do apoptoze stanica.

Nespecifično djeluje u ciklusu te se gotovo uvijek koristi u kombinaciji s drugim citostaticima.

Cisplatina je jedan od najučinkovitijih i najšire upotrebljivanih citostatika. Upotrebljava se u liječenju karcinoma jajnika, pluća, testisa, jednjaka, želudca, mokraćnog mjehura.

Kliničko korištenje je često ograničeno njezinim nepovoljnim utjecajem, uključujući nefrotoksičnost, mučninu i povraćanje i mijelotoksičnost, od kojih je bubrežna toksičnost najozbiljniji limitirajući čimbenik (Behling i sur. 2006).

Hepatotoksičnost se ne smatra limitirajućom dozom toksičnosti za CDDP, ali toksičnost jetre može se pojaviti primjenom velikih doza (Zicca i sur. 2004).

Često, za vrijeme terapije, pacijenti razvijaju otpornost na cisplatinu. Laboratorijska i klinička istraživanja pokazala su mnogostruke mehanizme koji uzrokuju otpornost tumora na cisplatinu.

Oni uključuju: smanjen prijenos citostatika, povećanje detoksifikacije u stanici, promjene u učinkovitosti DNK popravaka i apoptoze stanica te povećanje isticanja lijeka.

Oksidativni stres je jedan od najvažnijih mehanizama u otrovnosti prouzročenoj CDDP-om. Mitochondriji su primarna meta CDDP-om induciranog oksidativnog stresa, što rezultira gubljenjem mitohondrijski proteina, inhibicijom unosa kalcija i smanjenjem potencijala mitohondrijske membrane (Mansouri sur. 2006).

Dokazano je da antioksidansi štite od štetnih učinaka cisplatine (Chan i sur.2006).

## 1.4 Hipertermija

Prvi pisani podaci o upotrebi hipertermije u liječenju tumora nalaze se u medicinskom tekstu Edwin Smith Surgical Papyrus. Tekst je pronađen u Egiptu te datira oko 3000 godina prije Krista. U njemu se spominje upotreba vatre u liječenju tumora dojke. Grcima je upotreba hipertermije bila među važnijim metodama u liječenju tumora i dr. bolesti.

Riječ hipertermija potječe iz starog grčkog jezika (hiper- više, iznad i therme- toplina) te označava stanje nekog tijela koje ima veću temperaturu od normalne.

U kliničkoj onkologiji, hipertermija označava svaku temperaturu koja podiže temperaturu tijela iznad normalnih vrijednosti. U liječenju tumora učinkovito se smatra temperatura viša od 41°C.

S obzirom na način primjene, hipertermija može biti:

**Sistemska (opća) hipertermija** – zagrijava se cijelo tijelo. Primjenjuje se uglavnom kod raširene metastatske bolesti, leukemija i limfoma. Temperatura ne smije prijeći 42°C jer bi došlo do ireverzibilnih oštećenja vitalnih organa (mozak, jetra). Provodi se u vrućim kupkama u kojima se temperatura održava između 41,5 i 42°C tijekom jednog sata.

**Lokalna i regionalna hipertermija** najčešće se primjenjuje s pomoću ultrazvuka frekvencije 3000 kHz -3 MHz. Lokalna hipertermija se koristi u liječenju solidnih tumora koji su smješteni na površini ili nešto dublje ispod površine tijela. Pri ovom obliku liječenja temperatura se održava između 42 i 45°C. Regionalna hipertermija se primjenjuje kod lokalno uznapredovalog tumorskog procesa koji zahvaća i regionalne limfne čvorove, a samim tim i veću površinu tijela (Šamija i sur. 2006).

Hipertermija ima dva nedostataka. Kod tumora koji su smješteni duboko u tkivima i organima dolazi do neravnomjernog i nedovoljnog dovođenja topline u tumorsko tkivo.

Drugi nedostatak je nedovoljna termometrija tj. sva tehnička sredstva za mjerenje apsorbirane energije u dubokim tkivima i organima su teško primjenjiva i invazivna.

U *in vivo* uvjetima su zloćudne stanice termoosjetljivije od zdravih stanica što se pripisuje mikrookolišu koji okružuje zloćudnu stanicu (acidoza, hipoksija, manjkava mikrocirkulacija). Kod normalnog tkiva, pod utjecajem hipertermije, u krvnim žilama se povećava protok i do deset puta. Povećan protok kroz zagrijano tkivo omogućuje brže hlađenje. Krvne žile karcinoma zbog patološke angiogeneze nemaju značajke normalnih krvnih žila.

Djelovanjem hipertermije krvne žile pucaju i dolazi do izostanka protoka krvi kroz tumor, a time i hlađenja. Toplinska energija se nakuplja i izravno ubija tumorske stanice.

Normalne stanice su dobro opskrbljene kisikom, nutritivnim tvarima i imaju normalni pH te su termootpornije od tumorskih stanica. Zbog slabe prokrvljenosti tumorskih stanica dolazi do hipoksije i acidoze.

Terapijski korisna temperatura kreće se od 41<sup>0</sup>C do 45<sup>0</sup>C. Biološki učinak hipertermije ovisi o jačini temperature te o vremenu izlaganja temperaturi. Temperature iznad 45<sup>0</sup>C se vrlo rijetko primjenjuju jer izazivaju ireverzibilna oštećenja u normalnom tkivu. Podižući temperaturu za jedan stupanj skraćuje se trajanje liječenja na pola uz isti učinak (izoeft).

Pri liječenju hipertermijom, ograničavajući čimbenik je nastanak termotolerancije. To je stečeno svojstvo stanice koje nastaje tijekom duljeg perioda zagrijavanja na temperaturi nižoj od 42<sup>0</sup>C ili nakon kratkotrajnog izlaganja višim temperaturama.

Dobra učinak se postiže ako se tumor kratko vrijeme zagrijava na visokoj temperaturi a zatim nastavi na nižoj.

### 1.4.1 Biološki učinci hipertermije

Hipertermija izaziva promjene na gotovo svim staničnim dijelovima: membrani, citoskeletu, citosolu i jezgri.

#### **Membrana**

Stanična membrana je u dodiru s unutarstaničnom i vanstaničnom tekućinom te reagira na sve promjene u okolini. Ona ima najveće značenje u nastanku stanične smrti uzrokovane hipertermijom.

Membranski fosfolipidi i proteini, pod utjecajem hipertermije, doživljavaju strukturne i funkcionalne promjene, primjerice promjene u membranskoj viskoznosti i fluidnosti. Intermembranski proteini, koji se nalaze u fosfolipidnom dvosloju i koji su stabilizatori stanične membrane, utjecajem hipertermije bivaju oštećeni te dolazi do porasta stanične propusnosti i promjena u pasivnom prijenosu i poremećaju u izmjeni kalcija i kalija.

### ***Citoskelet***

On omogućuje vezu između stanične membrane i jezgre. Hipertermija uzrokuje znatne promjene svih komponenti citoskeleta (mikrofilamenti, mikrotubularni i intermedijarni filamenti). Stupanj tih oštećenja ovisi o visini temperature, dužini liječenja te tipu stanica. Mikrofilamenti imaju bitnu zadaću u održavanju citoplazmatske strukture.

Mikrotubularni filamenti sudjeluju u tvorbi diobenog vretena, a pod utjecajem visoke temperature se raspadaju te ne dolazi do mitoze. Intermedijarni filamenti vežu mikrotubule za staničnu membranu, a hipertermijom se raspadaju i gube strukturu.

### ***Citosol***

Hipertermija uzrokuje strukturne i funkcionalne promjene citosolnih elemenata (mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i Golgijeva aparata). Lizosomi i polisomi bivaju znatno oštećeni, a sinteza proteina zaustavljena. Mitohondriji zbog visoke temperature postaju natečeni, potom ispucani i nefunkcionalni.

Pod utjecajem visoke temperature na jezgri se zbivaju strukturne i funkcionalne promjene; poremećaj replikacije DNA, transkripcije RNA i sustav popravka DNA (Turić i sur. 1996).

U najranijoj fazi stresa dolazi do induciranja odgovora na stres. Taj odgovor uključuje brzu sintezu evolucijski sačuvane skupine proteina zvane proteini stresa (engl. heat shock proteins, HSP). Glavna funkcija tih proteina je omogućiti stanici da preživi dok se ne uklone uzroci stresa; uklanjanjem stresa količina proteina stresa u unutarstaničnoj tekućini vrati se na početnu razinu. Ukoliko uzrok stresa ostane prisutan dulje vrijeme ili ako se njegov intenzitet poveća, prisutnost HSP-a može biti nedostatna da bi se stanica dalje štitila. Sinteza HSP-a se tada obustavlja i započinje apoptoza (Neil i sur. 1998).

#### **1.4.2 Hipertermija i kemoterapija**

Hipertermija se rijetko primjenjuje sama za sebe. Najčešće se primjenjuje zajedno s zračenjem (radioterapijom) i/ili kemoterapijom (citostaticima).

Razlog tome je što hipertermija djeluje direktno citotoksično, povećava osjetljivost tumora na zračenje (radiosenzitivno) i na kemoterapiju (kemosenzitivno). Istodobnom primjenom hipertermije i kemoterapije može se postići izlječenje oboljelih dok pojedinačnom terapijom to nije moguće. Antitumorski učinak ovisi o dozi lijeka, o vremenu primjene lijeka i temperaturi.

Kod istodobne primjene dolazi do sinergističkog učinka, a ako se citostatik primjenjuje prije ili poslije hipertermije, učinak je aditivan.

Tumorsko tkivo sastoji od aerobnih i anaerobnih stanica koje su različito osjetljive na cispaltinu. Aerobne stanice su osjetljive na cisplatinu te još više na temperaturu pa ako se primjene zajedno postiže se sinergistički učinak.

Anaerobne stanice su rezistentne na cisplatinu, a veoma osjetljive na hipertermiju. Stoga zajednička primjena nema nikakvog dodatnog učinka.

Mehanizam na koji povišena temperatura pospješuje toksični učinak lijeka, nisu u potpunosti poznati. Oni su različiti za svaku skupinu lijekova.

Alkilirajući lijekovi, u koje spada i cisplatina, uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove na DNA koje zbog djelovanja temperature mogu biti jače oštećene (Turić i sur. 1996).

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog rad je istražiti genotoksični učinak citostatika cisplatine i propolisa na leukocite periferne krvi, stanice bubrega, stanice jetre i na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora Swiss albino miševa nositelja tumora te utvrditi mogući mehanizam protutumorske učinkovitosti nakon preventivne obrade miševa u uvjetima njihove fiziološke tjelesne temperature ( $37^{\circ}\text{C}$ ) i uvjetima hipertermije ( $43^{\circ}\text{C}$ ).

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU

#### 3.1.1 Pokusne životinje

U istraživanju smo koristili visokosrodne miševe istog spola, soja Swiss albino, dobi oko 2 mjeseca, mase 20 – 25 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševi smo držali u kavezima s najviše 5 životinja uz stalnu dostupnost standardne hrane za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vode. Istraživanje smo proveli u skladu s važećim etičkim principima R Hrvatske, (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86-23, 1985).

#### 3.1.2 Tumorske stanice

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. U jetri miševa, nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima. Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavali smo serijskim presađivanjem vijabilnih stanica intraperitonealno (*i.p.*) svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa u Swiss albino miševima. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 ml fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravili smo rez i otvorili peritonealnu šupljinu miša te pasteurovom pipetom uzeli sadržaj iz trbušne šupljine miša s tumorskim stanicama i razrijedili s fiziološkom otopinom (0.9% otopina natrij klorida, Pliva) do ciljane koncentracije  $2 \times 10^6$  EAT stanica/0.5 mL. Broj živih stanica odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoju komorici. Unos EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

#### 3.1.3 Propolis

U istraživanju smo koristili propolis porijeklom iz stacionarnog pčelinjaka koji je smješten u okolici Zagreba. Od sirovog propolisa pripremili smo vodenu otopinu propolisa.

### 3.1.3.1 Vodena otopina propolisa

Vodenu otopinu propolisa (VOP) pripremili smo usitnjavanjem i otapanjem propolisa u 96% etanolu tijekom 3 dana pri temperaturi 20 – 25°C, uz povremeno miješanje.

Nakon otapanja, alkoholna otopina propolisa je odvojena od taloga filtriranjem kroz filter papir, a potom uparena do suhog na vakuumskom uparivaču (Buchi-rotapor <R>, Švicarska). Na svakih 10 g ovako pripremljenog propolisa, dodali smo 150 mL 8% otopine lizina (L-Lysine 98%, Sigma), a potom smo miješali tijekom 30 minuta na magnetskoj miješalici pri temperaturi 50°C. Nakon filtriranja, otopinu smo uparili do suhog (Nikolov i sur., 1987). Suhi prah smo čuvali u hladnjaku pri temperaturi 4°C. Neposredno prije uporabe, otapanjem u vodi pripremili smo vodenu otopinu propolisa i injicirali miševima u dozi od 50 mg kg<sup>-1</sup>.

### 3.1.3 Citostatik

U istraživanju je korišten citostatik cisplatina (Cisplatin, Pliva). Za potrebe pokusa, neposredno prije uporabe razrijeđen je u vodi za injekcije u dozi 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>.

## 3.2 METODE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU

### 3.2.1 Postupak sa životinjama

Za istraživanje genotoksičnog učinka miševe smo slučajnim odabirom raspodijelili u pokusne skupine s 5 životinja. Sedam i tri dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica miševima smo injicirali *i.p.* pripravak vodene otopine propolisa u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup>. Cisplatinu u dozi od 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup> pri normalnoj temperaturi (37°C) i pri uvjetima hipertermije (43°C) injicirali smo 3. dana nakon unosa tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu miša.

Neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu, životinje su uspavane u eksikatoru s dietil eterom. Uzorke stanica krvi, jetre, bubrega i tumora za procjenu genotoksičnog učinka, propolisa, cisplatine te njihovog združenog učinka analizirali smo komet testom 1 sat nakon *i.p.* primjene citostatika cisplatine pri normalnim i hipertermalnim uvjetima.

### 3.2.2 Intraperitonealna hipertermija

Intraperitonealnu hipertermiju napravili smo unosom fiziološke otopine *i.p.* u količini  $2 \times 2$  mL, prethodno zagrijane u vodenoj kupelji na 43°C neposredno prije primjene citostatika. Ovaj postupak smo primijenili na svim pokusnim skupinama neovisno o primjeni citostatika.



Jednak postupak primijenili smo i za kemoterapiju pri 37°C pri čemu je fiziološka otopina prethodno zagrijana u vodenoj kupelji na 37°C.

### 3.2.3 Komet test

Pripremu preparata krvi, tkiva jetre, bubrega i tumora za komet test napravili smo 1 sat nakon primjene citostatika. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 ml fiziološke otopine i lagane masaže trbuha, napravili smo rez na trbušnoj šupljini miša te Pasteurovom pipetom uzeli sadržaj peritonealne tekućine s stanicama tumora. Krv je uzeta Pasteurovom pipetom iz pazušnog spleta krvnih žila miševa. Tkivo jetre i bubrega homogenizirali smo protiskivanjem kroz Miracloth mrežicu (Falcon) u puferu [0.075 M NaCl (Kemika) i 0.024 M Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), pH 7.5], prethodno ohlađenom na 4°C, u omjeru tkiva i pufera 1 : 1.

Na brušena predmetna stakalca (Surgipath) nanijeli smo svježe pripremljenu otopinu 1% agaroze normalne točke tališta (Sigma), a potom je prekrili pokrovnicom. Nakon polimerizacije pri temperaturi 20 – 25°C, pokrovnicu smo uklonili sa stakalca, a gel ostrugali. Na osušeno stakalce mikropipetom smo nanijeli 300 µL svježe pripremljene 0.6% agaroze normalne točke tališta, koja je potom prekrivena pokrovnicom i ostavljena na ledu tijekom 10 minuta. Nakon polimerizacije i uklanjanja pokrovnice, nanijeli smo slijedeći sloj sastavljen od 100 µL 0.5% agaroze niske točke tališta (Sigma) pomiješane s 5 µL uzorka (krv, stanice bubrega, jetre ili tumora) koji je potom prekriven pokrovnicom. Nakon slijedećih 10 minuta polimerizacije na ledu, nanijeli smo sloj od 100 µL 0.5% agaroze niske točke tališta i ostavili na ledu tijekom 10 minuta. Nakon polimerizacije, s preparata smo uklonili pokrovnicu.

Radi lize staničnih struktura preparate smo uronili u prethodno ohlađeni pufer za lizu [2.5 M NaCl (Kemika), 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), 1% Na-sarkozinat (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), pH 10], uz dodatak 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% DMSO (Kemika) za postizanje ciljane vrijednosti pH, tijekom 2 sata pri temperaturi 4°C. Postupkom lize uklonili smo stanične i jezgrene membrane te proteine, a DNA uklopljena u gelu ostaje u obliku nukleotida.

Iz pufera za lizu, preparate smo premjestili u horizontalnu kadnicu za elektroforezu (Life Technologies) sa svježe pripremljenim lužnatim puferom za denaturaciju [0.3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), pH 13], što omogućuje odmatanje zavojnice DNA i ekspresiju oštećenja osjetljivih na lužnate uvjete. Preparate smo stavili u smjeru anode, gdje su držani tijekom 20 minuta pri temperaturi 4°C, zaštićeni od svjetla, radi sprječavanja nastanka daljnjih oštećenja DNA.

Potom, u jednakim uvjetima tijekom slijedećih 20 minuta proveli smo elektroforezu u električnom polju istosmjerne struje stalne jakosti 300 mA i napona 25 V, pri čemu se slobodni ulomci negativno nabijene molekule DNA kreću kroz agarozni gel od stanične jezgre prema anodi.

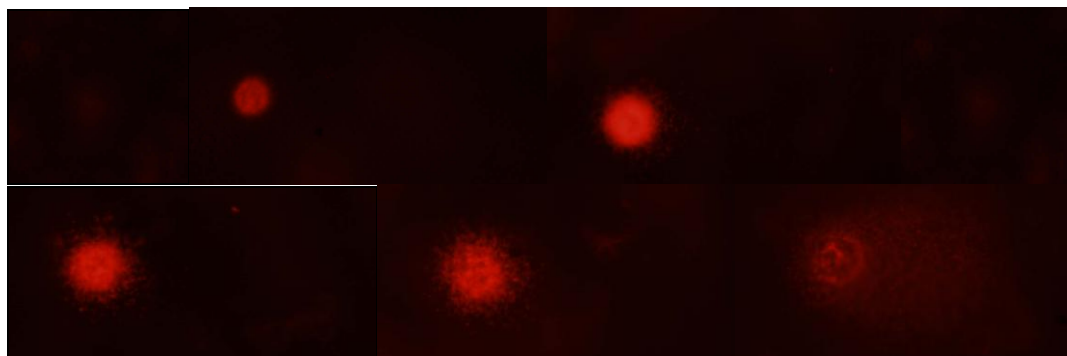
Nakon elektroforeze, preparate smo lagano isprali s puferom za neutralizaciju [0.4 M Tris-HCl (Sigma), pH 7.5]. Ispiranje je ponovljeno 3 puta u vremenskim intervalima od 5 minuta. Nakon neutralizacije, preparate smo obojili fluorescentnom bojom etidij-bromid (Kemika) koncentracije  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  i pokrili pokrovnicom. Tijekom 10 minuta, preparate smo držali zaštićene od svjetla, a potom analizirali pod fluorescentnim mikroskopom s ekscitacijskim filterom valne duljine 515 – 560 nm i graničnim filterom valne duljine 590 nm pri povećanju  $400\times$  (Olympus, Japan).

Analizirano je 100 stanica po preparatu odnosno ukupno 400 stanica iste vrste iz pojedine pokusne skupine. Oštećenje DNA i genotoksični učinak kvantificirani smo prema strukturama koje pod fluorescentnim mikroskopom nalikuju na komete sastavljene od glave i repa. Naime, stanice uklopljene u agarozu predmetnog stakalca primjenom neionskog detergenta i soli visoke molarne mase liziraju se oblikujući nukleoide koji su sastavljeni od prstenastih zavojnica DNA povezanih nuklearnim matriksom. Elektroforeza u lužnatim uvjetima rezultira nastankom struktura koje nalikuju na komete.

Odlomljeni dijelovi DNA oslobođeni tijekom lize staničnih struktura i odmatanja zavojnice DNA, tijekom procesa elektroforeze slobodno se kreću prema anodi, oblikujući rep kometa. Neoštećena DNA oblikuje glavu kometa i tijekom procesa elektroforeze se zbog velike molekularne mase ne može kretati u agaroznom gelu. Relativni odnos glave i duljine repa odgovara broju lomova DNA unutar stanice (Collins, 2004).

Stanice smo prema duljini repa kometa svrstali u pet razreda, od 0 do 4 (Slika 2). Ukoliko komet nije imao repa svrstan je u razred 0, a kometi s najduljim repom svrstani su u razred 4. Ukupni rezultat za pojedinu pokusnu skupinu izračunali smo na slijedeći način:  $[0 \times N_0 \text{ (broj kometa razreda 0)} + 1 \times N_1 \text{ (broj kometa razreda 1)} + 2 \times N_2 \text{ (broj kometa razreda 2)} + 3 \times N_3 \text{ (broj kometa razreda 3)} + 4 \times N_4 \text{ (broj kometa razreda 4)}]$ .

Sve preparate analizirala je jedna osoba radi izbjegavanja subjektivnosti u procjeni duljine repa kometa.



Slika 2. Komete različitih razreda

### 3.3 Statistička obrada rezultata

Statistička značajnost rezultata istraživanja testirana je analizom varijance (ANOVA).

## 4. REZULTATI

U ovom istraživanju istražili smo genotoksični učinak cisplatine u kombinaciji s propolisom na miševe nositelje EAT-a u uvjetima njihove fiziološke tjelesne temperature ( $37^{\circ}\text{C}$ ) i u uvjetima hipertermije ( $43^{\circ}\text{C}$ ). Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s vodenom otopinom propolisa u dozi od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  stanica EAT. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi od  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  i u dozi od  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  3. dan nakon unosa EAT stanica.

Životinje smo podijelili u skupine od A do F. Skupina A predstavlja kontrolu, a skupina B životinje koje su primile vodu otopinu propolisa u dozi  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . Skupinu obrađenu samo cisplatinom označili smo sa C ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i E ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Sa D i F smo označili skupine koje su primile vodu otopinu propolisa ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i cisplatinu  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  odnosno  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Koristili smo standardni alkalni komet test koju su predložili Singh i sur (1988). Svi izmjereni parametri statistički su obrađeni ANOVOM na nivou značajnosti od  $p < 0,05$ . Napravljena je procjena oštećenja DNA na temelju mjerenja duljine komet repa koja je u pozitivnom suodnosu s duljinom odlomljenih ulomaka DNA.

Duljinu komet repa klasificirali smo u 5 kategorija, od 0 tj. neoštećene stanice bez repa do 4 tj. potpuno oštećene stanice s maksimalnom dužinom komet repa. Oštećenja stanica su određena jedan sat nakon primjene citostatika cisplatine.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ( $S.V. \pm S.D.$ ) pojedine skupine životinja ( $n=4$ ) prema ukupnom broju kometa - TSC (engl. total comet score, TSC) izračunu:  $[0 \times N_0 \text{ (broj kometa razreda 0)} + 1 \times N_1 \text{ (broj kometa razreda 1)} + 2 \times N_2 \text{ (broj kometa razreda 2)} + 3 \times N_3 \text{ (broj kometa razreda 3)} + 4 \times N_4 \text{ (broj kometa razreda 4)}]$ .

Nakon istraživanja i obrade podataka rezultati komet testa prikazani su u Tablicama od 1 do 5.

Rezultati pokazuju da primjena cisplatine ima genotoksični učinak na tumorske, ali i zdrave stanice (leukocitne stanice periferne krvi, bubrega, jetre). Rezultati komet testa na leukocitima periferne krvi pokazali su da cisplatina ( $5$  i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) te cisplatina ( $5$  i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) u kombinaciji s propolisom ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ima jak toksični učinak na te stanice te dovodi do znatnog povećanja duljina komet repa u odnosu na kontrolnu skupinu pri fiziološkim uvjetima ( $37^{\circ}\text{C}$ ) te do značajnijeg povećanje pri hipertermalnim uvjetima ( $43^{\circ}\text{C}$ ) (Tablica 1a i 1b).

Rezultati komet testa na stanicama bubrega pokazali su značajno povećanje duljine komet repa za cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) te cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s propolisom (50 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolnu skupinu pri fizikalnim uvjetima (37<sup>0</sup>C) te u uvjetima hipertermije (43<sup>0</sup>C) (Tablica 2a i 2b).

Rezultati komet testa na stanicama jetre pokazali su značajno povećanje duljine komet repa za cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) te cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s propolisom (50 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolnu skupinu pri fizikalnim uvjetima (37<sup>0</sup>C), a značajnije u uvjetima hipertermije (43<sup>0</sup>C) (Tablica 3a i 3b).

Kod tumorski stanica uz primjenu cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) te cisplatinu (5 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s propolisom (50 mg kg<sup>-1</sup>), pri fiziološkim uvjetima i hipertermalnim uvjetima, također dolazi do oštećenja molekula i povećanja dužine komet repa u odnosu na kontrolnu skupinu. Iznimka je kod primjene cisplatinu (5 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s propolisom (50 mg kg<sup>-1</sup>) pri fiziološkim uvjetima gdje dolazi do smanjenja oštećenja DNA. (Tablica 4a i 4b).

Pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima, primjena cisplatinu u kombinaciji s propolisom dovodi do smanjenja oštećenja molekula DNA normalnih stanica dok kod tumorskih stanica kombinacija primjene citostatika i propolisa dovodi do povećanja oštećenja (Tablica 5).

Rezultati pokazuju da cisplatina ima najveći toksični učinak na jetru, od normalnih stanica, te na tumorske stanice (Tablica 5).

Toksični učinak cisplatinu povećava se pri hipertermalnim uvjetima (43<sup>0</sup>C) te s povećanjem doze citostatika (Tablica 5).

U skupinama od C do F dolazi do statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 1a.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa leukocitnih stanica krvi sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom analizirana alkalnim komet testom

Skupina 37 °C	Stanice krvi na 37 °C							
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	365	35	0	0	0	35	0,087 ±0,025	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	356	44	0	0	0	44	0,11±0,027	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	35	223	130	9	3	522	1,305 ± 0,14	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	171	119	97	6	7	359	0,897 ± 0,207	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	17	355	24	4	815	2,037±0,075	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	78	214	40	60	8	506	1,265±0,212	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 1b.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa leukocitnih stanica krvi sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom uz primjenu hipertermije (43°C) analizirana alkalnim komet testom

Skupina 43 °C	Stanice krvi na 43°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	365	35	0	0	0	35	0,087 ±0,025	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	379	18	3	0	0	24	0,06±0,01	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	0	40	310	48	2	812	2,03±0,25	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	110	116	140	18	16	514	1,285±0,369	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	17	355	24	4	815	2,037±0,075	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	0	130	194	34	42	788	1,97±0,311	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 2a.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica bubrega sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom analizirana alkalnim komet testom

Skupina 37 °C	Stanice bubrega na 37°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	378	22	0	0	0	22	0,055 ± 0,025	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	390	10	0	0	0	10	0,025 ± 0,021	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	35	223	139	3	0	510	1,28±0,63	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	133	154	67	43	3	429	1,107 ± 0,156	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	40	310	48	2	812	2,03±0,25	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	36	108	236	18	2	642	1,605 ± 0,240	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0 \text{ (broj kometa razreda 0)} + 1 \times N_1 \text{ (broj kometa razreda 1)} + 2 \times N_2 \text{ (broj kometa razreda 2)} + 3 \times N_3 \text{ (broj kometa razreda 3)} + 4 \times N_4 \text{ (broj kometa razreda 4)}]$ .



**Tablica 2b.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica bubrega sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom uz primjenu hipertermije ( $43^{\circ}\text{C}$ ) analizirana alkalnim komet testom

Skupina 43 °C	Stanice bubrega na 43°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (a. u.) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	373	27	0	0	0	27	0,067±0,038	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	382	18	0	0	0	18	0,045±0,0292	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	80	112	20	14	174	890	2,22±0,877	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	20	120	104	94	62	858	2,14±0,340	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	2	64	88	44	202	1180	2,95±0,479	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	10	146	114	64	66	830	2,07±0,362	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 3a.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica jetre sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom analizirana alkalnim komet testom

Skupina 37 °C	Stanice jetre na 37 °C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	383	17	0	0	0	17	0,0425 ±0,022	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	374	26	0	0	0	26	0,065 ±0,032	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	28	165	167	40	0	619	1,55±0,77	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	118	170	52	22	38	492	1,23 ± 0,117	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	8	348	42	2	838	2,095±0,057	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP mg kg <sup>-1</sup> (F)	80	112	20	174	14	730	1,825±0,571	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 3b.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica jetre sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom uz primjenu hipertermije (43 °C) analizirana alkalnim komet testom

Skupina 43 °C	Stanice jetre na 43 °C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	383	17	0	0	0	17	0,0425±0,017	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	350	47	3	0	0	53	0,24 ± 0,072	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	6	42	56	162	134	1176	2,94±0,684	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	14	62	112	146	66	988	2,47±0,386	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	2	50	226	122	1268	3,17±0,013	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	10	40	60	268	22	1052	2,63±0,9	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05;

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 4a.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica tumora sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom analizirana alkalnim komet testom

Skupina 37 °C	Stanice tumora na 37 °C							Statistički značajno p vrijednost između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (A)	280	107	13	0	0	133	0,33 ± 0,043	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	230	134	29	7	0	213	0,532 ± 0,249	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	0	94	276	18	12	748	1,87±0,3	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	38	226	120	10	6	520	1,3±0,253	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	40	310	48	2	812	2,03±0,25	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	6	92	194	78	30	834	2,08± 0,285	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 4b.** Srednja vrijednost  $\pm$  SD dužine repa stanica tumora sa oštećenom DNA nakon preventive obrade miševa nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora propolisom te s cisplatinom uz primjenu hipertermije (43 °C) analizirana alkalnim komet testom

Skupina 43 °C	Stanice tumora na 43°C							
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							Statistički značajno p vrijednost između grupa (ANOVA test)
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. $\pm$ S.D.	
Kontrola (A)	260	127	13	0	0	153	0,38 $\pm$ 0,55	
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	196	100	90	14	0	322	0,80 $\pm$ 0,480	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C )	0	8	358	32	2	828	2,07 $\pm$ 0,0258	C-A $\rightarrow$ p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	0	12	300	58	30	906	2,265 $\pm$ 0,253	D-A $\rightarrow$ p<0,05; D-C $\rightarrow$ p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	24	316	36	24	860	2,15 $\pm$ 0,082	E-A $\rightarrow$ p<0,05; D-C $\rightarrow$ p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + VOP 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	0	0	216	108	76	868	2,17 $\pm$ 0,1545	F-A $\rightarrow$ p<0,05; F-C $\rightarrow$ p<0,05; F-E $\rightarrow$ p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-a u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V.  $\pm$  S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 5.** Komet test na stanicama leukocita periferne krvi, bubrega, jetre i tumora u miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne imunoterapije pripravcima propolisa te kemoterapije cisplatinom

Skupina	Temperatura 37°C				Temperatura 43°C			
	Stanice krvi	Stanice bubrega	Stanice jetre	Stanice tumora	Stanice krvi	Stanice bubrega	Stanice jetre	Stanice tumora
Kontrola	0,087 ±0,025	0,055 ± 0,025	0,0425 ±0,022	0,33 ± 0,043	0,087 ±0,025	0,067±0,038	0,0425±0,017	0,38±0,55
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup>	0,11±0,027	0,025 ± 0,021	0,065 ±0,032	0,532 ± 0,249	0,06±0,01	0,045±0,0292	0,24 ± 0,072	0,80±0,480
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup>	1,305 ± 0,14*	1,28±0,63*	1,55±0,77*	1,87±0,3*	2,03±0,25*	2,22±0,877*	2,94±0,684*	2,07±0,0258*
Cispl. 5 mg kg <sup>-1</sup> +								
VOP 50 mg kg <sup>-1</sup>	0,897 ± 0,207*	1,107 ± 0,156*♦	1,23 ± 0,117*♦	1,3±0,253*	1,285±0,369*	2,14±0,340*	2,47±0,386*♦	2,265±0,253*♦
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup>	2,037±0,075*	2,03±0,25*	2,095±0,057*	2,03±0,25*	2,037±0,075*	2,95±0,479*	3,17±0,013*	2,15±0,082*♦
Cispl. 10 mg kg <sup>-1</sup> +								
VOP50 mg kg <sup>-1</sup>	1,265±0,212*♦	1,605 ± 0,240*♦	1,825±0,571*♦	2,08± 0,285*♦♦	1,97±0,311*♦♦	2,07±0,362*♦♦	2,63±0,9*♦	2,17±0,1545*♦♦

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s VOP-om u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema izračunu:  $[0 \times N_0 \text{ (broj kometa razreda 0)} + 1 \times N_1 \text{ (broj kometa razreda 1)} + 2 \times N_2 \text{ (broj kometa razreda 2)} + 3 \times N_3 \text{ (broj kometa razreda 3)} + 4 \times N_4 \text{ (broj kometa razreda 4)}]$ .

\* Statistički značajno ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (ANOVA).

♦ Statistički značajno ( $p < 0.05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

• Statistički značajno ( $p < 0.05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

## 5. RASPRAVA

Ovim diplomskim radom pokušali smo utvrditi genotoksično djelovanje propolisa u preventivnoj obradi s citostatikom cisplatina u normalnim (37<sup>0</sup>C) i hipertermalnim uvjetima (43<sup>0</sup>C) na životinje nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora. Istraživanje je izvedeno na način da su praćena oštećenja na molekulama DNA na normalnim stanicama (leukociti periferne krvi, jetra, bubrezi) te tumorskim stanicama, metodom alkalnog komet testa. Alkalni komet test je metoda osjetljiva na citotoksične i genotoksične učinke istraživanih tvari. On otkriva jednolančane lomove DNK te ukrižene veze DNA – DNA i DNA – proteina nastale uslijed djelovanja neke genotoksične tvari. Metoda je brza, jednostavna te relativno jeftina i pokazala se vrlo korisnom.

Primarna oštećenja DNA u stanicama nastaju kao posljedica oksidativnog stresa prouzročenog izlaganjem stanica djelovanju cisplatine. Kao posljedica oksidativnog stresa, u staničnoj DNA nastaje velik broj dodatnih oštećenja što se može otkriti komet testom.

Komet test u alkalnim uvjetima je pogodna metoda dovoljno osjetljiva za procjenu različitih tipova oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi, stanicama jetre i bubrega i tumorskim stanicama izazvanih preventivnom primjenom propolisa te njegove kombinacija s cisplatinom.

Liječenje tumora danas zahtjeva kombinaciju različitih terapijskih metoda te kod primjene kemoterapije upotrebu više različitih citostatika kako bi se spriječila rezistencija tumorskih stanica. Rezistencija tumorskih stanica nije praćena i povećanom rezistencijom zdravih stanica na citostatike. Istodobna primjena više citostatika omogućuje postizanje maksimalne smrtnosti tumorskih stanica unutar toksične tolerancije za svaki citostatik, pokrivanje šireg područja rezistentnih stanica u heterogenoj tumorskoj populaciji te usporavanje razvoja novih rezistentnih stanica (Roth, 1996).

Neki specifični mehanizmi rezistencije na citostatike pokazuju na koji način tumorska stanica izbjegava dobro definirane putove napada promijenjenog citostatika, a to mogu biti:

1. Povećano izbacivanje citostatika iz stanice
2. Povećani stanični mehanizam detoksikacije
3. Mehanizam oporavka
4. Promjene u specifičnom mehanizmu prijenosa

Većina citostatika je uspješna u uništavanju tumorskih stanica budući da interferiraju direktno ili indirektno sa sintezom ili funkcijom nukleinskih kiselina. Međutim citostatici uzrokuju oštećenja i zdravih stanica, što se očituje supresijom koštane srži, gubitkom kose, mučninom itd. Brojni bolesnici iz tih razloga odbijaju primjenu kemoterapije.

Naša istraživanja pokazuju da primjena cisplatine ima genotoksični učinak, kako na zdrave tako i tumorske stanice (Tablica 5). Od normalnih stanica najviše su stradale stanice jetre i bubrega (Tablica 2a i b, 3a i b). Štetan utjecaj cisplatine na jetru pokazala su i druga istraživanja (Mansour, 2006). Oštećenja su veća pri većoj dozi citostatika ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) te pri hipertermalnim uvjetima ( $43^{\circ}\text{C}$ ). Toksičnost cisplatine na bubrege dokazala su i istraživanja Behlinga (2006).

Primjena kemoterapije zajedno sa hipertermijom ima nekoliko prednosti. Hipertermija pokazuje sinergistički učinak sa nekim lijekovima koji se koriste protiv tumorskih stanica što su potvrdili i rezultati našeg istraživanja (Tablica 5). Ona potiče različite citostatike iz različitih skupina od kojih neki nisu učinkoviti bez primjene sa hipertermijom. Korištenje hipertermije u kombinaciji s različitim citostaticima prvi je laboratorijski primijenio George Hahn koji je u svojim istraživanjima pokazao da citostatici pri povišenoj temperaturi imaju bolju protutumorsku učinkovitost; povećavaju broj mrtvih tumorskih stanica. Učinak hipertermije je znatno veći u rasponima temperature od  $40^{\circ}\text{C}$  -  $45^{\circ}\text{C}$  u odnosu na niže temperature. Mehanizmi učinka hipertermije nisu u potpunosti razjašnjeni (Herman i sur. 1988). Hipertermija niža od  $42^{\circ}\text{C}$  rijetko može izliječiti životinje oboljele od tumora, međutim ako se ona primjeni zajedno sa citostaticima, tada se može postići znatno bolji terapijski učinak. Taj učinak je tim jače izražen što je vremenski razmak između pojedine primjene kraći, a najizraženiji je ako se hipertermija i citostatik daju istodobno (Šamija i sur., 2000.).

Naime, poznato je da se antitumorska aktivnost cisplatine temelji na otpuštanju dvaju iona  $\text{Cl}^-$  u vodenoj otopini; otpuštanjem klora u stanici preostaje pozitivno nabijena platina kompleks koji se veže na negativno nabijene molekule u stanici, posebice DNK i RNK, tvoreći bifunkcionalne kovalentne veze što rezultira inhibicijom replikacije i transkripcije DNK. Ujedno dolazi do stvaranja monofunkcionalnih adukta na gvaninu, bifunkcionalni adukta između dva gvanina na jednom lancu DNK, zatim između gvanina i bilo kojeg drugog nukleotida. Također se stvaraju adukti između gvanina na komplementarnim lancima te križne veze između DNK, proteina i glutaciona.



Takve strukturne promjene u uzvojnici DNK uzrokuju blok G2 fazi staničnog ciklusa (Hausmann 2004.). Kod alkilirajućih lijekova dolazi do povećane topivosti citostatika pri povišenoj temperaturi koja je također uzrok strukturnih i funkcionalnih promjena stanične membrane, promjena u prijenosu citostatika u stanice, smanjenom popravku DNA zbog oštećenja enzima te smanjene sinteze enzima, te pojačanom vezanju cisplatine za proteine plazme što posljedično dovodi do brojnih jednolančanih i dvolančanih lomova, te križnih veze DNK i pojačane smrti stanica tumora. Prema literaturnim podacima (Herman i sur. 1988.) ovaj sinergizam između cisplatine i hipertermije je najveći pri istovremenoj primjeni kao što smo mi primijenili u našim pokusima. Iz naših rezultata je razvidno da je hipertermija povećala osjetljivost tumorskih stanica na cisplatinu (kemosenzitacijski učinak).

Kod određivanja terapije za liječenje od velike važnosti je specificirati liječenje. Cilj je odabrati terapiju sa maksimalnim učinkom i minimalnom toksičnošću za pacijenta. Uzevši to u obzir, hipertermija nudi još jednu prednost, a to je niska toksičnost. Prednost hipertermije, za razliku od kemoterapije, je lokalizacija što omogućuje izbjegavanje područja tijela koja su osjetljiva kao kao što su koštana srž, jetra, mozak.

Hipertermija se bazira na činjenici da su tumorske stanice više osjetljive na toplinu nego zdravo tkivo. Međutim, teško je zagrijavati samo tumorske stanice pomoću hipertermije jer na zagrijavanje utječu razni faktori kao što je veličina tumora i položaj tumora. Neizbježan tehnički problem je otežano uniformno zagrijavanje samo tumorskog područja do potrebne temperature, a da se ujedno ne ošteti normalno tkivo (Kawai i sur., 2005).

Mehanizmi kojima hipertermija ubija stanice su kontraverzni, kao i načini kojima povišene temperature povišavaju citotoksičnost citostatika. Iako mehanizam hipertermije nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavljene su četiri mogućnosti:

1. Povećane koncentracije lijekova unutar stanica
2. Povećana učinkovitost stvaranja ozljeda
3. Pojavljivanje raznih ozljeda na hipertermičkim temperaturama
4. Toplinom izazvana inhibicija popravka DNA

Rezultati pokazuju da je stupanj oštećenja leukocitnih stanica periferne krvi, bubrega i jetre kao i tumorske stanice, manji primjenom kemoterapije, sa i bez upotreba propolisa, pri 37°C nego kod kemoterapije istim spojevima pri 43°C (Tablice 1a- 4b).

Neka istraživanja su pokazala da kod stanica koje su otporne na citostatik hipertermija povećava učinkovitost citostatika na stanice koje su razvile otpornost, ali ipak kombinacija citostatika i hipertermije ne postiže razinu citotoksičnosti koja je prisutna u stanicama koje nisu razvile otpornost (Herman, 1988).

Iz navedenog je vidljivo da se javlja potreba pronaći tvari sa zaštitnim učinkom tj. citoprotektore koji nisu toksični za zdrave stanice i ne smanjuju terapijski učinak citostatika, a umanjuju štetni učinak citostatika u zdravim stanicama. Propolis i njegove sastavnice te brojni flavonoidi kao što su kvercetin, silimarin, biacelin korišteni su u brojnim istraživanjima da bi se istražila njihova zaštitna uloga te su dali pozitivan rezultat. U našem istraživanju istražili smo zaštitni učinak propolisa.

Naši rezultati dobiveni komet testom potvrđuju zaštitni učinak propolisa i njegovih sastavnica od posljedica nastalih primjenom citostatika na normalne stanice (leukocitne stanice periferne krvi, stanice bubrega i jetre) te pojačani toksični učinak na stanice tumora.

Zaštitni učinak propolisa vidljiv je kod stanica krvi i jetre obrađene cisplatinom ( $5$  i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) s propolisom ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) gdje je uočeno značajno smanjenje razine oštećenja DNA pri  $37^{\circ}\text{C}$  i  $43^{\circ}\text{C}$  u odnosu na upotrebu same cisplatine ( $p < 0,05$ ; ANOVA) (Tablice 2a i b, 4a i b).

Rezultati komet testa na leukocitima periferne krvi potvrđuju genotoksičnost cisplatine te je vidljivo da nakon preventivne terapije vođenom otopinom propolisa, postotak oštećenja DNA je manji u odnosu na samu cisplatinu (Tablica 1a i b). Pri hipertermalnim uvjetima dolazi jačeg oštećenja, a razlog tome može biti bolja bioraspoloživost sastavnica propolisa pri fiziološkim uvjetima. Antioksidacijski potencijal i bioaktivnost flavonoida, koji su sastavni dio propolisa, ovisi o njihovoj apsorpciji, metabolizmu te redukcijskim svojstvima nastalih metabolita.

Zaštitni učinci propolisa i njegovih polifenolnih sastavnica na rast tumora uključuju mnoge mehanizme djelovanja uključujući skupljanje slobodnih radikala (Chen 2004), modifikaciju detoksifikacijskih enzima, imunomodulaciju i pobuđivanje apoptoze i/ili nekroze (Aso, 2004; Oršolić, 2005). Imunomodulacija imunosnog sustava domaćina posebice uključuje aktivaciju makrofaga, a preko njih i drugih imunskih stanica. Aktivirani makrofagi aktivni su sudionici imunih reakcija na tumor. Učinak makrofaga na tumor može biti specifičan ili nespecifičan.

Mehanizmi nespecifičnog protutumorskog učinka makrofaga temelje se na njihovoj aktivaciji te pojačanoj proizvodnji enzima lizosoma i metabolita reaktivnog kisika i dušikovog oksida (Oršolić i Bašić, 2003; 2005). Makrofagi se predočavanjem tumorskih antigena T i B stanicama uključuju u specifičnu imunost.

Nadalje propolis ima izraziti protubakterijski učinak, potiče hematopoezu, stimulira imunosne stanice domaćina te potiče proces zacjeljivanja što zasigurno pomaže u produžavanju životnog vijeka oslabljenog organizma nazočnošću tumora i posljedica nastalih primjenom kemoterapeutika.

Uništavanje hematopoetskih stanica smanjuje imunitet organizma i povećava mogućnost infekcije. Prethodna istraživanja u ovom laboratoriju su pokazala da kombinacija kemoterapije sa propolisom utječe na proliferaciju populacije leukocita u perifernoj krvi koja je inhibirana kemoterapijskim sredstvima. Ti rezultati pokazuju da flavonoidi iz propolisa imaju hemostimulativna, antioksidativna, zaštitna i regenerativna svojstva (Oršolić i sur., 2008)

U primjeni istih doza cisplatine u kombinaciji s propolisom kod stanica tumora uočili smo povećanje oštećenja molekula DNA pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima. Izuzetak je kod primjene cisplatine  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  i propolisa pri fiziološkim uvjetima (Tablice 4a i b).

Iz toga je vidljivo da upotreba propolisa u kemoterapiji povećava učinkovitost protutumorskih lijekova, a slabi njihov štetan učinak na okolno zdravo tkivo.

Antioksidansi upotrijebljeni kao dodatak u kemoterapiji povećavaju učinkovitost protutumorskih lijekova i/ili slabe njihov štetni učinak na okolno normalno tkivo (Conclin, 2004, Oršolić i Bašić, 2005; 2007; Kapiszewska i sur., 2007). Također smanjuju nuspojave na leukocitima, jetri i bubrezima te tako omogućuju povećanje doze (Oršolić i sur., 2008).

Dobiveni rezultati protutumorskog učinka su u suglasju s rezultatima Oršolić i Bašić (2007) gdje je pokazano da propolis i njegove flavonoidne sastavnice pokazuju izrazit protutumorski učinak temeljen na više različitih mehanizama, primjerice njihovim antioksidativnim svojstvima, modulaciji aktivnosti onkogeni, poticanju procesa apoptoze te inhibiciji angiogeneze.

Mehanizmi međudjelovanja istraživanih tvari i citostatskih protutumorskih lijekova nisu točno utvrđeni te se javljaju potrebe za daljnjim istraživanjima.

Cjelokupni rezultati dobiveni u ovom laboratoriju vezani za istraživanje učinkovitosti propolisa i njegovih polifenolnih/flavonoidni sastavnica ukazuju na mnogostruku učinkovitost propolisa i flavonoida u smanjenju posljedice genotoksičnosti citostatika te stimuliranju imunskih stanica domaćina čija učinkovitost vodi usporavanju rasta tumora i njegovom uništavanju. Propolis udružen s citostatikom povećava protutumorski učinak kemoterapeutika i vodi povećanom preživljavanju miševa. Zasigurno ovim procesima doprinosi ne samo njihova antioksidativna sposobnost i veliki kapacitet vezanja slobodnih radikala što vodi smanjenju genotoksičnih oštećenja krvnih, jetrenih i bubrežnih stanica nego i njihova imunomodulatorna, zacjeljivačka, protubakterijska, protumikrobna aktivnost kao važni čimbenici u značajno dužem preživljavanju životinja i njihovom brzom oporavku. Posebice je važno istaći da normalne stanice imaju veću sposobnost oporavka (regeneracije) od tumorskih kao i veću mogućnost iskorištavanja vanjskih antioksidanasa u zaštitne svrhe.

Temeljem dobivenih rezultata sinergizam između cisplatine i flavonoidnih sastavnica nazočnih u VOP-u te hipertermije na toksičnost i duljinu komet repa mogao bi se temeljiti na: (i) povećanju citotoksičnosti cisplatine ili poticanju apoptoze, (ii) dokidanju rezistencije na cisplatinu inhibicijom P-glikoproteinske (Pgp) crpke, (iii) sinergističkom djelovanju flavonoida i kemoterapeutika na topoizomerase I i II, (iv) inhibiciji protein tirozin kinazne aktivnosti; (v) inhibiciji aktivnosti transkripcijskog faktora- nuklearnog faktora kappa B (NFκB), (vi) modulaciji detoksikacije enzima faze I i II, (vii) stimulaciji imunološkog sustava; (viii) modulaciju steroidnih hormona (fitoestrogenska aktivnost), (ix) inhibiciji angiogeneze; (x) inhibicija aktivacije mitotskih signala, (xi) inhibicija ekspresija tumorskih onkogeni i aktivacija ekspresije tumor supresor gena, (xii) inhibicija prooksidativnih enzima; (xiii) smanjenju izražavanja HSP u tumorskim stanicama što potiče sinergističko djelovanje flavonoida i hipertermije na apoptozu; (xiv) hipoksiji, posebice na niskom pH koji se odnosi na povećanu proizvodnju mliječne kiseline i slab protok krvi povećavajući osjetljivost tumorskih stanica na citostatik i hipertermiju; (xv) inhibiciji prijenosa mliječne kiseline flavonoidima što povećava osjetljivost na hipertermiju (Oršolić i Bašić 2007.; Oršolić i sur. 2008.a,b).

Sinergističko djelovanje cisplatine i hipertermije pri istovremenoj primjeni ima najveću protutumorsku učinkovitost što je u skladu i sa istraživanjima Hermnana i sur. (1998).

Propolis utječe na znatno smanjenje genotoksičnost cisplatine na normalne stanice te može smanjiti toksičnost citostatika, a ujedno povećava genotoksičnost cisplatine na tumorske stanice (Oršolić i sur., 2008).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja učinaka propolisa, citostatika cisplatine i hipertermije na miševima nositeljima Ehrlichovog ascitesnog tumora došli smo do slijedećih zaključaka:

1. Propolis i citostatik cisplatina imaju protutumorski učinak na stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora u miševa. Primjena citostatika cisplatine u kombinaciji s propolisom ima veći protutumorski učinak nego primjena same cisplatine.
2. Propolis i njegove flavonoidne sastavnice imaju zaštitni učinak na normalne stanice (leukocitne stanice periferne krvi, stanice bubrega i jetre) te smanjuju oštećenja nastala primjenom citostatika cisplatine.
3. Citotoksični i genotoksični učinak citostatika cisplatine i propolisa ovisan je o primijenjenoj dozi i izloženosti hipertermiji.
4. Citotoksični i genotoksični učinak citostatika cisplatine na stanice je veći što je veća doza citostatika cisplatine.
5. Hipertermija ima sinergističko djelovanje s cisplatinom tj. povećava njezin genotoksični učinak na stanice tumora.
6. Obrada propolisom i njegovim flavonoidnim sastavnicama može smanjiti posljedice toksičnosti citostatika te pojačati stimulaciju imunosnih stanica koje usporavaju rast tumora.
7. Daljnjim istraživanjem trebalo bi detaljnije istražiti pretpostavljene mehanizme djelovanja propolisa, citostatika cisplatine i hipertermije na modelu miša.

## 7. LITERATURA

- Aso K., Kanno S., Tadano T., Satoh S., Ishikawa M. (2004): Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharm Bull.* 27(5): 727-730.
  
- Bankova V. (2005): Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence – based Complement Alternat Med* 2(1): 29-32
  
- Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A. G. (2002): Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch [C]* 57(5-6): 530-533
  
- Behling E. B., Sendao M. C., Francescato H. D. C., Antunes L. M. G., Costa R. S., Bianchi M. L., (2006): Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacological Reports* 58: 526 – 532.
  
- Chan M. M., Soprano K. J., Weinstein K., Fong D. (2006): Epigallocatechin-3-Gallate Delivers Hydrogen Peroxide to Induce Death of Ovarian Cancer Cells and Enhances Their Cisplatin Susceptibility. *Journal of cellular physiology* 207:389–396.
  
- Chen C., Weng M., Wu Ch Lin J. (2004): Comparision of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources *CAM* 1(2): 175-185.
  
- Collins AR (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology.* 26(3): 249-261.
  
- Ghisalberti E. (1979): Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84
  
- Hausmann R. E., Cooper G. M. (2004.): Rak. U: Hausmann R.E., Cooper G. M. Stanica – molekularni pristup. *Medicinska naklada, Zagreb*, str. 633, 640-641

- Herman T. S., Teicher B. A., Chan V., Collins L. S., Kaufmann M. E., Loh C. (1998): Effect of hyperthermia on the Action of cis – Diamminedichloroplatinum(II), Rhodamine 123 [Tetrachloroplatinum(II)], Rhodamine 123, and Potassium Tetrachloroplatinate in Vitro and Vivo. *Cancer research* 48: 2335 – 2341.
- Juretić A. (2000.): Metastaziranje i angiogeneza. U: Šamija M. i sur. *Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb*, str. 43 -44
- Kawai N., Ito A., Nakahara Y., Futakuchi M., Shirai, Honda H., Kobayashi T., Kohri K., (2005.): Anticancer Effect of Hyperthermia on Prostate Cancer Mediated by Magnetite Cationic Liposomes and Immune-Response Induction in Transplanted Syngeneic Rats. *The Prostate* 64:373 – 381.
- Kumar V., Cotran., Robbins S. L. (2000.): Novotvorine. U: Kumar V., Cotran., Robbins S.L. *Osnove patologije – prema petom američkom izdanju, Školska knjiga, Zagreb*, str. 171 – 215.
- Mansour H. H., Hafez H. F., Fahmy N. M., (2006.): Silymarin Modulates Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(6): 656 – 661.
- Marcucci M. C. D., (1995): Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99
- O'Neill K. L., Fairbairn D. W., Smith M. J., Poe B. S., (1998.): Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines. *Apoptosis* 3: 369 – 375.
- Oršolić N, Bašić I., (2003): Immunomodulation by water-soluble derivate of propolis (WSDP) a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol* 84: 265-273
- Oršolić N., (2006): Zdravlje iz košnice. [http://www.pcelarstvo.hr/dr.nada\\_orsolic-17.html](http://www.pcelarstvo.hr/dr.nada_orsolic-17.html), 04.12.2009.



- Oršolić N., Brbot Šaranović A, Bašić I., (2005): Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Medica* 72: 14-19
- Oršolić N., Bašić I., (2005): Water soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J. Ethnopharmacol* 102 (1): 37-45
- Oršolić N., Bašić I., (2007): Cancer prevention by Propolis and its Polyphenolic Compounds in Experimental Animals Recent Progress in medical plants 17: 55-113
- Oršolić N., Horvat-Knežević A., Benković V., Bašić I., (2008): Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. *Transworld Research Network*. 195 – 222.
- Pavelić K. (2000.): Molekularno - genetička osnova raka. U: Šamija M. i sur. *Onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb, str. 19 - 21
- Radačić M., (1996): Termoterapija i fototerapija tumora. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. *Klinička onkologija*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 250 – 256
- Radić S., PROPOLIS Lijek 21. stoljeća? <http://hedera.hr/publikacije/propolis-lijek-21-stoljea-dr-saa-radi/> , 26.11.2009.
- Roth A. (1996.): Načela kemoterapije. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. *Klinička onkologija*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 209 – 221.
- Santos N. A. G., Bezerra C. S. C., Martins N. M., Curti C., Bianchi M. L. P., Santos A. C., (2007.): Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin – induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol*. DOI 10.1007 / s00280-007-0459-y.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL., (1988.): A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.

- Šamija M., Vrdoljak E., Krajina Z. (2006.): Klinička onkologija. Medicinska naklada, Zagreb: str. 13 – 14, 20, 26 - 30, 39-44, 177
- Taradi M. (2004.): Imunoreakcija na tumor. U: Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 324-325, 327 - 330
- Tomek R. (2000.): Sistemska liječenje tumora. U: Šamija M. i sur. Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 152 - 156
- Zicca, A., Cafaggi, S., Mariggio, M. A., Vannozzi, M. O., Ottone, M., Bocchini, V., Caviglioli, G. and Viale M., (2004): Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. Eur. J. Pharmacol. 442: 265-272.
- Ž.Grabarević (2002.): Veterinarska onkologija. DSK – FALCO, Zagreb, str. 23, 26 – 27, 29 – 32, 36, 141 – 142, 314 - 315